

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4335314号
(P4335314)

(45) 発行日 平成21年9月30日 (2009. 9. 30)

(24) 登録日 平成21年7月3日 (2009. 7. 3)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 9/80 (2006. 01)

C 1 2 N 9/80

C 1 2 N 1/20 (2006. 01)

C 1 2 N 1/20

A

C 1 2 P 13/02 (2006. 01)

C 1 2 P 13/02

C 1 2 P 41/00 (2006. 01)

C 1 2 P 41/00

J

C O 7 C 213/02 (2006. 01)

C O 7 C 213/02

請求項の数 12 (全 33 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平9-541630
 (86) (22) 出願日 平成9年5月30日 (1997. 5. 30)
 (65) 公表番号 特表2000-512488 (P2000-512488A)
 (43) 公表日 平成12年9月26日 (2000. 9. 26)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP1997/002838
 (87) 国際公開番号 W01997/045529
 (87) 国際公開日 平成9年12月4日 (1997. 12. 4)
 審査請求日 平成16年4月14日 (2004. 4. 14)
 (31) 優先権主張番号 1359/96
 (32) 優先日 平成8年5月30日 (1996. 5. 30)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)
 (31) 優先権主張番号 282/97
 (32) 優先日 平成9年2月10日 (1997. 2. 10)
 (33) 優先権主張国 スイス (CH)

(73) 特許権者 398075600
 ロンザ アーゲー
 スイス国、シーエイチー４０５２ パーゼ
 ル、ミュンヘンシュタイナーシュトラッセ
 ３８
 (74) 代理人 100058479
 弁理士 鈴江 武彦
 (74) 代理人 100108855
 弁理士 蔵田 昌俊
 (74) 代理人 100091351
 弁理士 河野 哲
 (74) 代理人 100088683
 弁理士 中村 誠
 (74) 代理人 100109830
 弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノアルコールおよびその誘導体の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

下記的一般式の化合物から選んだシクロペンテン誘導体

【化 1】



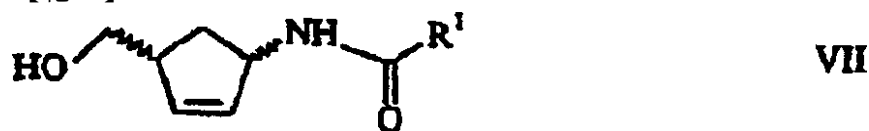
(式中、R¹はC₁－C₄アルキル、C₁－C₄アルコキシ、アリールまたはアリロキシである。)

を、唯一の窒素源として、唯一の炭素源として、または唯一の窒素源および炭素源として資化することのできる微生物、ならびにこの微生物からの酵素エキストラクトであって、前記微生物は、アルカリゲネス／ボルデテラ F B 1 8 8 (D S M 1 1 1 7 2)、ロドコッカス・エリスロポリス C B 1 0 1 (D S M 1 0 6 8 6)、アースロバクター s p . H S Z 5 (D S M 1 0 3 2 8)、ロドコッカス s p . F B 3 8 7 (D S M 1 1 2 9 1)、アルカリゲネス・キシロソキシダンス s s p . デニトリフィカンス H S Z 1 7 (D S M 1 0 3 2 9)、またはゴールドナ s p . C B 1 0 0 (D S M 1 0 6 8 7) の種から選択され、
 前記酵素エキストラクトは、N－アセチルアミノアルコールハイドロラーゼ活性を有し、
 前記微生物から得られ、かつ下記的一般式の化合物から選んだシクロペンテン誘導体を加水分解する能力を有する

10

20

【化 2】



(式中、 R^1 は C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルコキシ、アリールまたはアリロキシである。)

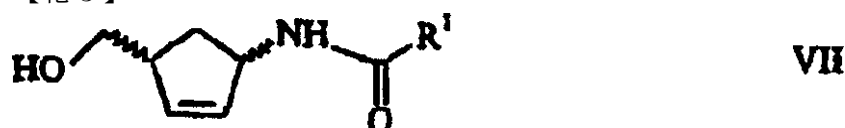
ことを特徴とする微生物ならびに酵素エキストラクト。

【請求項 2】

N-アセチルアミノアルコールヒドロラーゼ活性を有する酵素であって、請求項 1 の微生物から得られ、かつ下記の一般式の化合物から選んだシクロペンテン誘導体

10

【化 3】



(式中、 R^1 は C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルコキシ、アリールまたはアリロキシである。)

を加水分解する能力を有し、下記の事項を特徴とする酵素： a) pH 7.0 ± 1.0 を最適 pH とすること、b) pH 7.0 において 25 °C から 30 °C の間の温度を最適温度とすること、および c) 基質として 1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを用いたときの K_M が、22.5 mM ± 7.5 mM (30 °C、100 mM リン酸緩衝液) であること。

20

【請求項 3】

請求項 2 に記載の酵素であって、さらに下記の事項を特徴とする酵素： d) N-末端アミノ酸配列が、Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-Thr-Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn であること、および e) SDS-PAGE により決定される分子量が 50 kD であること。

【請求項 4】

下記の一般式 I および/または II の、(1R, 4S)-および/または(1S, 4R)-1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテン

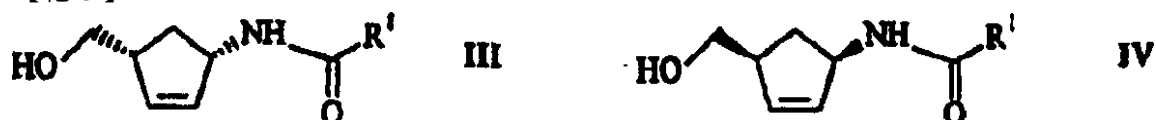
30

【化 4】



、および/または下記の一般式 III および/または IV の、(1S, 4R)-および/または(1R, 4S)-アミノアルコール誘導体

【化 5】

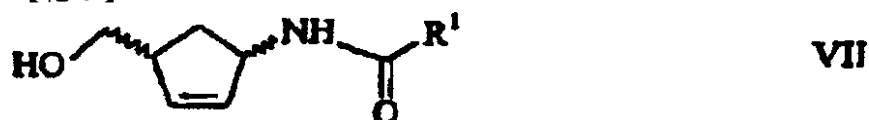


40

(式中、 R^1 は C_1-C_4 アルキル、 C_1-C_4 アルコキシ、アリールまたはアリロキシである。)

を製造する方法であって、
一般式

【化 6】



(式中、 R^1 は上記した意味を有する。)

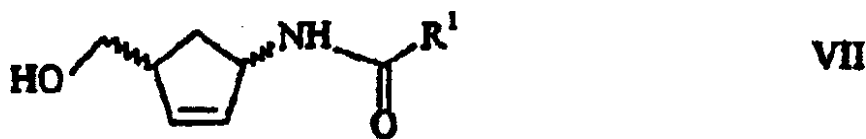
50

のシクロペンテン誘導体を、請求項1の微生物および／または酵素エキストラクト、請求項2の酵素、および／またはペニシリンGアシラーゼを使用して、式Iおよび／またはIIの化合物に転化し、適切であれば、この転化の結果生成したそれらの化合物および／または式IIIおよび／またはIVのアミノアルコール誘導体を単離することからなる製造方法。

【請求項5】

一般式

【化7】



10

(式中、R¹は上記した意味を有する。)

のシクロペンテン誘導体を、第一工程で、下記の一般式の(±)-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オン

【化8】



をアシル化して、下記一般式の(±)-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オン誘導体とし、

20

【化9】



(式中、R¹は上記した意味を有する。)

第二工程で、この化合物を還元して一般式VIIのシクロペンテン誘導体とすることを特徴とする請求項4の製造方法。

30

【請求項6】

第一工程のアシル化を、下記の一般式のカルボン酸ハロゲン化物

【化10】



(式中、Xはハロゲン原子をあらわし、R¹は上記した意味を有する。)

を使用して行なうか、または下記の一般式のカルボン酸無水物

【化11】



40

(式中、R¹は上記した意味を有する。)

を使用して行なうことを特徴とする請求項5の製造方法。

【請求項7】

第一工程のアシル化を、アプロティックな溶媒の中で実施することを特徴とする請求項5または6の製造方法。

【請求項8】

50

第二工程の還元を、アルカリ金属またはアルカリ土類金属のボロハイドライド、アルカリ金属またはアルカリ土類金属のアルミニウムハイドライドおよび／または**ビトライドVitr**ide（登録商標）を用いて実施することを特徴とする請求項5ないし7のいずれかの製造方法。

【請求項9】

第二工程の還元を、プロティックな溶媒の中で実施することを特徴とする請求項5ないし8のいずれかの製造方法。

【請求項10】

一般式VIIのシクロペンテン誘導体の反応を、ロドコッカス、ゴールドナ、アースロバクター、アルカリゲネス、アグロバクテリウム／リゾビウム、バチルス、シュードモナスまたはアルカリゲネス／ボルデテラ属から選んだ微生物を使用して行なうことを特徴とする請求項4ないし9のいずれかの製造方法。

【請求項11】

一般式VIIのシクロペンテン誘導体の反応を、バチルス・メガテリウムまたはエシェリチア・コリの種の微生物から得たペニシリンGアシラーゼを使用して行なうことを特徴とする請求項4ないし9のいずれかの製造方法。

【請求項12】

一般式VIIのシクロペンテン誘導体の反応を、温度20ないし40℃、pH5ないし9において実施することを特徴とする請求項4ないし11のいずれかの製造方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、下記の式の(1R, 4S)－または(1S, 4R)－1－アミノ－4－(ヒドロキシメチル)－2－シクロペンテン

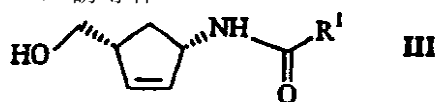


I



II

および（または）下記の一般式の(1S, 4R)－または(1R, 4S)－アミノアルコール誘導体

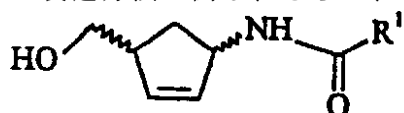


III



IV

の製造方法に関し、さらに、下記の一般式のシクロペンテン誘導体を、



VII

唯一の窒素源として、唯一の炭素源として、または唯一の窒素源および炭素源として資化することのできる微生物に関する。

本発明はさらに、これらの微生物から得られる、N－アセチルアミノアルコールヒドロラーゼ活性を有する酵素および酵素エキストラクトにも関する。

式Iの(1R, 4S)－1－アミノ－4－(ヒドロキシメチル)－2－シクロペンテンは、炭素環式のヌクレオサイドたとえばカルボビルCarbovir▲^R▼製造のための、重要な中間体である(Cambell et al., J. Org. Chem. 1995, 60, 4602-4616)。

(1R, 4S)－1－アミノ－4－(ヒドロキシメチル)－2－シクロペンテンの製造方法は、キャンベルCambell et al. (前掲書)およびパークPark K.H.およびラポポートRapoport H. (J. Org. Chem. 1994, 59, 394-399)に記載されている。

これらの方法で使用する先駆体は、D－グルコノ－δ－ラクトンまたはD－セリンであって、(1R, 4S)－N－tert－ブトキシカルボニル－4－ヒドロキシメチル－2－シクロペンテンに至るまでに約15の合成工程が必要であり、これを、次に保護基を離脱させて、(1R, 4S)－1－アミノ－4－(ヒドロキシメチル)－2－シクロペンテンとする。これら二つのプロセスはコストが高く、労力を要し、工業的に実施できるものではない。

WO 93/17020は、(1R, 4S) - 1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテンの製造方法を開示しており、その方法は、(1R, 4S) - 4-アミノ-2-シクロペンテン-1-カルボン酸をリチウムアルミニウムハイドライドで還元して所望の製品とする。

このプロセスの欠点は、一方ではシクロペンテン環の二重結合もまた還元されること、リチウムアルミニウムハイドライドは取り扱い難いこと、そして他方では、あまりにコストが高いことである。

テイラーら (Taylor, S.J. et al., Tetrahedron: Asymmetry Vol.4, No.6, 1993, 1117-1128) は、(1R, 4S) - 1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテンを、(±)-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンを前駆物質として、そこから出発する製造方法を記述している。この場合、前駆物質は、シュードモナス・ソラナセアルム *Pseudomonas solanacearum* またはシュードモナス・フルオレッセン *P. fluorescens* 種の微生物を利用して (1R, 4S) - 2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンに転化し、それを次にジ-tert-ブチルジカーボネートを用いて (1R, 4S) N-tert-ブトキシカルボニル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンに転化し、これをナトリウムボロハイドライドおよびトリフルオロ酢酸によって還元し、所望の製品にする。このプロセスもまた、あまりにコストが高い。

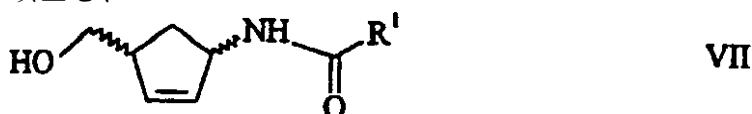
このほかには、マルチネラ (Martinez et al., J. Org. Chem. 1996, 61, 7963-7966) は、(1R, 4S) - 1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテンの、ジエチルジアルキルマロネートから出発する、10段階の合成法を記述している。このプロセスにも、工程が面倒であるという不利益があって、工業的には実施し難い。

本発明の目的は、簡単なプロセスで (1R, 4S) - 1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテンを製造する技術を提供することにある。

この目的は、請求項1に従う本発明の微生物、およびそれから抽出した酵素すなわち請求項4に従う本発明の酵素、ならびに請求項7に従う本発明の方法によって達成される。

本発明の微生物は、土壌のサンプルの中から、常用の微生物工学的的方法によって、土壌、汚泥または排水のサンプルの中から分離することができる。

微生物は、本発明に従って、下記の一般式をもつシクロペンテン誘導体の1種または2種以上を、



(式中、R¹はC₁₋₄アルキル、C₁₋₄アルコキシ、アリールまたはアリロキシ基をあらわす。)

- ・ 唯一の炭素源および窒素源として、
- ・ 適当な炭素源とともに、唯一の窒素源として、または
- ・ 適当な窒素源とともに、唯一の炭素源として

含有する栄養培地中で、微生物を培養することによって単離される。

C₁₋₄アルキルとしては、たとえばメチル、エチル、プロピル、イソプロピルまたはブチルが挙げられる。C₁₋₄アルコキシとしては、たとえばメトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシまたはtert-ブトキシが挙げられる。アリールとしては、たとえばフェニルまたはベンジルが挙げられる。ベンジルが好適に使用される。アリロキシとしては、たとえばベンジロキシまたはフェノキシが挙げられる。従って、下記の例は、一般式VIIのシクロペンテン誘導体として適当である。

- 1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン、
- 1-ブチリルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン、または
- 1-フェニルアセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン。

培養によって得た培養物から、式VIIのシクロペンテン誘導体の(1R, 4S)異性体を、唯一の窒素源として、唯一の炭素源として、または唯一の炭素源および窒素源として資

10

20

30

40

50

化する微生物を選択することが好都合である。

それらの微生物は、適当な窒素源として、たとえば、アンモニア、硝酸塩、アミノ酸または尿素を、成長の基質として使用することができる。微生物はまた、適当な炭素源として、たとえば、糖類、糖アルコール、 C_{2-4} カルボン酸またはアミノ酸を、成長の基質として使用することができる。糖類として、グルコースのようなヘキソース、またはペントースが使用できる。糖アルコールとして、たとえばグリセロールが使用できる。 C_{2-4} カルボン酸として、酢酸またはプロピオン酸が使用できる。アミノ酸としては、ロイシン、アラニン、アスパラギンが使用できる。

使用できる選択の培地および培養の培地は、当業者の間に常用されているものであって、たとえば、表1に記載のもの、または完全培地（イーストエキスを含有する培地）が使用

10

できるが、表1に記載のものを使用することが好ましい。

培養および選択の間、微生物からの活性な酵素が好都合に誘導される。一般式VIIのシクロペンテン誘導体が、酵素インデューサーとして使用できる。

培養および選択は、通常、 20°C から 40°C の温度で、好ましくは 30°C から 38°C の温度で、 5.5 から 8.0 までのpHで、好ましくは 6.8 から 7.8 までのpHで行なわれる。

好適な微生物は、ロドコッカス*Rhodococcus*、ゴルドナ*Gordona*、アースロバクター*Arthrobacter*、アルカリゲネス*Alcaligenes*、アグロバクテリウム/リゾビウム*Agrobacterium/Rhizobium*、バチルス*Bacillus*、シュードモナス*Pseudomonas*またはアルカリゲネス/ボルデテラ*Alcaligenes/Bordetella*などの属、とりわけ、ロドコッカス・エリスロポリス*Rhodococcus erythropolis* C B 1 0 1 (D S M 1 0 6 8 6)、アルカリゲネス/ボルデテラ F B 1 8 8 (D S M 1 1 1 7 2)、アースロバクター s p. H S Z 5 (D S M 1 0 3 2 8)、ロドコッカス s p. F B 3 8 7 (D S M 1 1 2 9 1)、アルカリゲネス・キシロソキシダンス*Alcaligenes xylosoxydans* ssp.デニトリフィカンス*denitrificans* H S Z 1 7 (D S M 1 0 3 2 9)、アグロバクテリウム・リゾビウム H S Z 3 0、バチルス・シンプレックス*Bacillus simplex* K 2、シュードモナス・プチダ*Pseudomonas putida* K 3 2、またはゴルドナ s p. C B 1 0 0 (D S M 1 0 6 8 7)、およびその機能的に等価な変異種および突然変異種である。ブダペスト条約に従う寄託を、ドイッチェ・ザムルング・フォン・ミクロオーガニズメン・ウント・ツエルクルトゥーレン G m b H (D S M Z)、マシュローダヴェク 1 b, D-3 8 1 2 4, ブラウンシュヴァイクに、微生物 D S M 1 0 6 8 6 および 1 0 6 8 7 は 1 9 9 6 年 5 月 2 0 日に、微生物 D S M 1 0 3 2 8 および 1 0 3 2 9 は 1 9 9 5 年 1 1 月 6 日に、微生物 D S M 1 1 2 9 1 は 1 9 9 6 年 1 0 月 8 日に、そして微生物 D S M 1 1 1 7 2 は 1 9 9 6 年 9 月 2 0 日に、それぞれ行なった。

20

30

「機能的に等価な変異種および突然変異種」は、当初の微生物と本質的に同じ特性と機能を有する微生物を意味する。このような変異種および突然変異種は、偶然に、たとえばUV照射などによって作ることができる。

アルカリゲネス/ボルデテラ (*Alcaligenes/Bordetella*) F B 1 8 8 (D S M 1 1 1 7 2) の分類学的記述

細胞の形	桿状	
幅 μm	0.5 - 0.6	
長さ μm	1.0 - 2.5	
運動性	+	
べん毛	周毛状	
グラム反応	—	10
3% KOHによる分解	+	
アミノペプチダーゼ (ツェルニー)	+	
孢子	—	
オキシダーゼ	+	
カタラーゼ	+	
ADH (アルコールデヒドロゲナーゼ)	—	20
NO_3 からの NO_2	—	
脱窒	—	
ウレアーゼ	—	
ゼラチンの加水分解	—	
酸 (OF 試験)		
グルコース	—	30
フラクトース	—	
アラビノース	—	
アジピン酸塩	+	
カプリン酸塩	+	
クエン酸塩	+	
マレイン酸塩	+	40
マンニトール	—	

ロドコッカス・エリスロポリス *Rhodococcus erythropolis* C B 101 (DSM 10686) の分類学的記述

1. コロニーの形態および色： 短く分岐した線状で、成長すると桿状および球状に分裂する。コロニーは光り輝き、部分的に合流していて、ピンク色がかったベージュ色である。
RAL 1001

2. ペプチドグリカンの特性アミノ酸： メソジアミノピメリン酸

3. 菌類酸： ロドコッカス菌酸； 菌酸の鎖長 (C_{32} - C_{44}) の測定、および DSM 菌酸データバンクに入っているデータとの比較により、ロドコッカス・エリスロポリス株の

パターンとの大きな類似性が見出された（類似度：0.588）。

4. 脂肪酸パターン： 非分岐、飽和および不飽和の脂肪酸プラス結核菌ステアリン酸

5. 菌株の16S rDNAの部分的な配列は、ロドコッカス・エリスロポリスの特定の領域におけるそれとの間で、高度（100%）の一致が見出された。

同定の結果は、相互に独立な3種の方法（菌酸、脂肪酸、16S rDNA）により、この菌株がロドコッカス・エリスロポリスとされたので、不明瞭ではない。

ゴルドナ *Gordona* s.p. CB 100 (DSM 10687) の分類学的記述

1. コロニーの形態および色： 短く分岐した線状で、成長すると桿状および球状に分裂する。コロニーは薄いオレンジ色である。（RAL 2008）

2. ペプチドグリカンの特性アミノ酸： メソジアミノピメリン酸

10

3. メナキノン・パターン： MK-9 (H₂) 100%

4. 菌類酸： ゴルドナ菌酸； 菌酸の鎖長（C₅₀—C₆₀）は、高温ガスクロマトグラフィーにより測定された。このパターンは、ゴルドナ属の代表的なものに見出されるパターンに対応する。

5. 脂肪酸パターン： 非分岐、飽和および不飽和の脂肪酸プラス結核菌ステアリン酸

6. 菌株の16S rDNAの部分的な配列に関して、ゴルドナ・ルプロペルチンクタの特定の領域における配列との間で、比較的低い98.8%の一致が見出されただけであった。

。

入手できた結果（メナキノン、菌類酸、脂肪酸、16S rDNA）に基づき、菌の区分は不明瞭でなくゴルドナ属への帰属を与えたが、これらの結果に基づいて、ゴルドナ属の既知の種に分類することは不可能であった。それゆえ、菌株DSM 10687は、ゴルドナ属の中で、新規であってこれまで記述されたことのない種であると推測される。

20

アルカリゲネス・キシロソキシダンス *Alcaligenes xylosoxydans* ssp. デニトリフィカンス *denitrificans* HSZ 17 (DSM 10329) の分類学的記述菌株の特性：

細胞の形	桿状	
幅 μm	0.5 - 0.6	
長さ μm	1.5 - 3.0	
運動性	+	
べん毛	周毛状	
グラム反応	-	10
3% KOHによる分解	+	
アミノペプチダーゼ (ツェルニー)	+	
孢子	-	
オキシダーゼ	+	
カタラーゼ	+	
嫌氣的増殖	-	20
ADH (アルコールデヒドロゲナーゼ)	+	
NO_3 からの NO_2	+	
脱窒	+	
ウレアーゼ	-	
加水分解		
ゼラチンの	-	30
ツイーン (Tween) 80 の	-	
酸 (OF 試験)		
グルコースから好氣的に	-	
キシロース 80 から	-	
基質の資化		
グルコース	-	40
フラクトース	-	
アラビノース	-	
クエン酸塩	+	
マレイン酸塩	+	
マンニトール	-	

特徴付け： グラム陽性 不規則桿状で顕著な桿菌－
球菌の成長サイクル； 厳格な好気性；
グルコースから酸、ガスを発生しない。

運動性 —

孢子 —

カタラーゼ +

細胞壁中にメソージアミノピメリン酸： なし

ペプチドグリカンのタイプ： A 3 α , L-Lys-L-Ser-L-Thr-L-Ala

16S rDNA 配列の類似性：最大の変動可能性を有する範囲の配列は、アースロバクター・パッセンス *pascens*、A. ラモスス *A. ramosus* およびA. オキシダンス *A. oxydans* との間に最高98.2%の値を与えた。

アグロバクテリウム／リゾビウム *Agrobacterium/Rhizobium* H S Z 3 0 の分類学的記述

10

20

細胞の形	多形的桿状	
幅 μm	0.6 – 1.0	
長さ μm	1.5 – 3.0	
グラム反応	—	
3% KOHによる分解	+	
アミノペプチダーゼ	+	10
孢子	—	
オキシダーゼ	+	
カタラーゼ	+	
運動性	+	
嫌氣的増殖	—	
硝酸塩からの亜硝酸塩	—	20
脱窒	—	
ウレアーゼ	+	
ゼラチンの加水分解	—	
酸		
L-アラビノースから	+	
ガラクトースから	—	30
メレジトースから	—	
フコースから	+	
アラビトールから	—	
マンニトールから	—	
エリスリトールから	—	
リトマスミルクのアルカリ性化	+	40
ケトラクトース	—	

16S rDNAの部分的配列は、アグロバクテリウム亜属およびリゾビウム亜属の代表的なものに対する、比較的高い類似度約96%を示した。これらの亜属の範囲内で、不明瞭でない種の決定をすることは不可能であった。

バチルス・シンプレックス *Bacillus simplex* K2 の分類学的記述

細胞の形

幅 μm 長さ μm

孢子

楕円形

円形

孢子嚢

カタラーゼ

嫌氣的増殖

V P 反応

桿状

0.8 - 1.0

3.0 - 5.0

—

—

—

—

+

—

n. g.

最高温度

増殖陽性温度℃ 40

増殖陰性温度℃ 45

増殖培地中 pH 5.7 —

NaCl 2% +

5% —

7% —

10% —

リゾチーム培地 +

酸 (ASS)

D-グルコースから +

L-アラビノースから +

D-キシロースから —

D-マンニトールから +

D-フラクトースから +

フラクトースからのガスの発生 —

レシチナーゼ —

加水分解

デンプン +

ゼラチン +

カゼイン —

ツイーン80 +

アエスクリン —

資化

クエン酸塩 +

プロピオン酸塩 —

硝酸塩からの亜硝酸塩 +

インドール —

フェニルアラニン・デアミナーゼ —

アルギニン・ジヒドロラーゼ —

細胞の脂肪酸を分析した結果、バチルス属への帰属が確認された。16S rDNAの部

10

20

30

40

50

分配列は、バチルス・シンプレックスへの100%の類似を示した。
 シュードモナス・プチダ *Pseudomonas putida* K32 の分類学的記述

細胞の形	桿状	
幅 μm	0.8 - 0.9	
長さ μm	1.5 - 4.0	
運動性	+	
べん毛	極性 > 1	10
グラム反応	-	
3% KOH による分解	+	
アミノペプチダーゼ	+	
孢子	-	
オキシダーゼ	+	
カタラーゼ	+	20
嫌氣的増殖	-	
色素		
蛍光	+	
ピオシアニン	-	
ADH	+	
硝酸塩から亜硝酸塩	-	30
脱窒	-	
ウレアーゼ	-	
ゼラチンの加水分解	-	
基質の資化		
アジピン酸塩	-	
クエン酸塩	+	40
マレイン酸塩	+	

D-マンデル酸塩	+	
フェニル酢酸塩	+	
D-酒石酸塩	—	
D-グルコース	+	
トレハロース	—	
マンニトール	—	10
ベンゾイルフォルメート	—	
プロピレングリコール	+	
ブチルアミン	+	
ベンジルアミン	+	
トリプタミン	—	
アセタミド	+	20
馬尿酸塩	+	

細胞の脂肪酸のプロフィールは、シュードモナス・プチダに典型的なものであった。

16S rDNAの部分配列は、シュードモナス・メンドキナおよびシュードモナス・アルカリゲネスへの約98%の類似度を示した。シュードモナス・プチダへの類似度は、97.4%であった。

ロドコッカス sp. FB 387 (DSMZ 11291) の分類学的記述

1. コロニーの形態および色： 短く分岐した線状で、成長すると桿状および球状に分裂する。コロニーはつやがなく、薄い赤～オレンジ色である。RAL 2008

2. ペプチドグリカンの特性アミノ酸： メソジアミノピメリン酸

3. 菌類酸： ロドコッカス菌酸； 菌酸の鎖長 (C_{32} — C_{44}) および DSMZ 菌酸データバンクに入っているデータとの比較により、ロドコッカス・ルーバー株のパターンと、ごく小さな（類似度0.019）類似性が見出されただけであった。この相関因子はあまりに低く、種の同定には使用できない。

4. 脂肪酸パターン： 非分岐、飽和および不飽和の脂肪酸プラス結核菌ステアリン酸。この脂肪酸パターンは、ロドコッカス属のすべての代表的な菌およびその近縁の菌、たとえばミコバクテリウム、ノカルディアおよびゴールドナに関して決定可能なものであった。脂肪酸パターンの定性的および定量的な差異を含めることにより、種のレベルにおける異同を決定しようとの企てがなされた。ロドコッカス sp. FB 387 の脂肪酸パターンを、データバンクに入っているデータと比較するため、多くの方法が使用された。それらの方法によっても、類似度が小さい（0.063）ため、ロドコッカス sp. FB 387 を、すでに記述されているロドコッカスの種に分類することは不可能であった。

5. 菌株の16S rDNAの部分配列に関して、96—818は、ロドコッカス・オパクスに、相関度97.9%をもって分類された。この配列の一致は、この分類法が、不明瞭でない種の決定するためには必要であるとしている、99.5%の相関度よりは低い。

入手できた結果に基づけば、菌株ロドコッカス sp. FB 387 は、ロドコッカスの、新規であってこれまで記述されたことのない種であると推測される。

本発明の酵素、すなわち前記の式VIIのシクロペンテン誘導体を加水分解することのできるN-アセチルアミノアルコールハイドrolラーゼは、たとえば、本発明の微生物の細胞を

10

20

30

40

50

、当業者にとっては常用の手法で破壊することによって得ることができる。このためには、たとえば、超音波やフレンチプレス法を使用することができる。これらの酵素は、たとえば、微生物ロドコッカス・エリスロポリス CB101 (DSM10686) から得ることができる。本発明の微生物、とくにロドコッカス・エリスロポリス CB101 (DSM10686) から得ることができる酵素は、次の特性を有することが好ましい。

- a) 最適 pH が、pH 7.0 ± 1.0 であること；
- b) 最適温度が、pH 7.0 において 25 °C から 30 °C の間にあること、および
- c) 基質 1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンに対する K_M の値が $22.5 \text{ mM} \pm 7.5 \text{ mM}$ (30 °C、100 mM リン酸緩衝液、pH 7.0) であること。

10

ロドコッカス・エリスロポリス CB101 (DSM10686) から得られる酵素の塩基配列を分析して、次のことがわかった。

d) N-末端アミノ酸配列 Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-Thr-Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn であること、

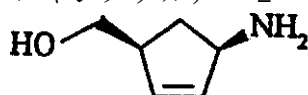
また、分子量の測定から、次のことがわかった。

e) SDS-PAGE により測定した分子量は 50 kD であること。

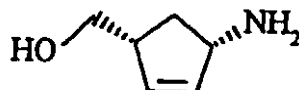
本発明の微生物、たとえばロドコッカス・エリスロポリス CB101 (DSM10686) から得られるそのような酵素は、次のような物質を加水分解する。たとえば、とりわけ、1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン、1-ブチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン、1-プロピオニルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンおよび 1-イソブチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンである。

20

本発明の、下記の式の (1R, 4S) - または (1S, 4R) - 1-アミノ-4- (ヒドロキシメチル) - 2-シクロペンテン

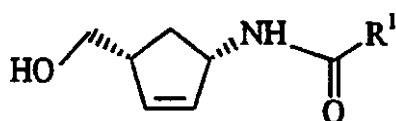


I

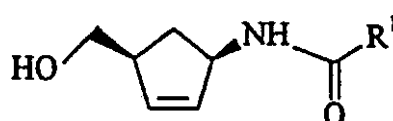


II

および (または) 下記の一般式の (1S, 4R) - または (1R, 4S) - アミノアルコール誘導体



III

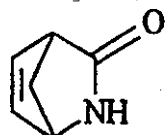


IV

30

(式中、 R^1 は前記した意味を有する)

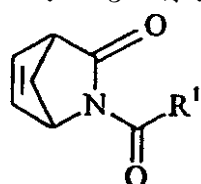
の製造方法は、たとえば第一工程で、下記の一般式の (±) - 2-アザビシクロ [2.2.1] ヘプト-5-エン-3-オン



V

をアシル化して、下記の一般式の (±) - 2-アザビシクロ [2.2.1] ヘプト-5-エン-3-オン誘導体とすることによって行なわれる。

40



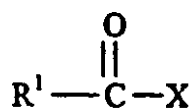
VI

(式中、 R^1 は上記した意味を有する。)

前駆体の (±) - 2-アザビシクロ [2.2.1] ヘプト-5-エン-3-オンは、EP-B0508352 に記載されているようにして、製造することができる。

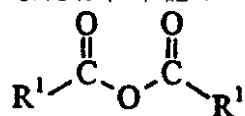
アシル化は、下記の一般式のハロゲン化カルボニルを使用するか、

50



VIII ,

(式中、Xはハロゲン原子をあらわし、R¹は上記した意味を有する)
 または、下記の一般式のカルボン酸無水物を使用して実施することができる。



IX ,

(式中、R¹は上記した意味を有する)

ハロゲン原子Xとしては、F、Cl、BrまたはIが使用できる。ClまたはFが、好ましく使用される。

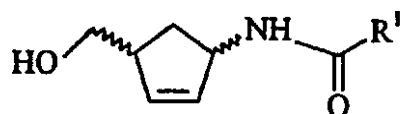
ハロゲン化カルボニルの例は、アセチルクロライド、クロロアセチルクロライド、ブチリルクロライド、イソブチリルクロライド、フェニルアセチルクロライド、ベンジルクロロホルメート (Cbz-Cl)、プロピオニルクロライド、ベンゾイルクロライド、アリルクロロホルメートまたはtert-ブチルフルオロホルメートである。カルボン酸無水物の例は、ジ-tert-ブチルジカーボネート、ブチリックアンハイドライド、アセチックアンハイドライドまたはプロピオニックアンハイドライドである。

アシル化は、溶媒なしでも実施できるし、またアプロティックな溶媒を用いても実施できる。

アシル化は、アプロティックな溶媒の中で、好都合に実施できる。適切なアプロティック溶媒の例は、ピリジン、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、テトラヒドロフラン、トルエン、メチレンクロライド、N-メチルピロリドンまたはこれらの混合物である。好ましく使用される溶媒は、ピリジンまたはアセトニトリル、とくにピリジンとアセトニトリルとの混合物である。

アシル化は、-80から50℃の温度で好都合に実施でき、好ましくは、0から25℃において実施される。

本発明の方法の第二工程では、式VIの(±)-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オン誘導体を還元して、下記の一般式のシクロペンテン誘導体とする。



VII

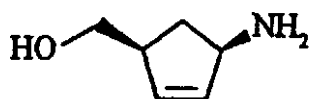
(式中、R¹は上記した意味を有する。)

還元は、アルカリ金属ボロハイドライドまたはアルカリ土類金属ボロハイドライドを用いて、またはアルカリ金属アルミニウムハイドライドまたはアルカリ土類金属アルミニウムハイドライドまたはビトライドVitride、すなわちナトリウムビス(2-メトキシエトキシ)アルミニウムハイドライドを用いて、好都合に実施することができる。ナトリウムまたはカリウムのアルミニウムハイドライドが、アルカリ金属アルミニウムハイドライドとして使用できる。ナトリウムまたはカリウムのボロハイドライドが、アルカリ金属ボロハイドライドとして使用できる。カルシウムボロハイドライドが、アルカリ土類金属ボロハイドライドとして使用できる。

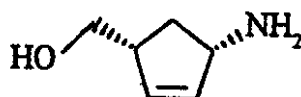
この還元は、プロティックな溶媒の中で好都合に実施することができる。使用できるプロティックな溶媒は、低級脂肪族アルコール、たとえばメタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、イソブタノール、sec-ブタノール、tert-ブタノールもしくは水、またはこれらの混合物である。

還元は、-40から40℃の温度で好都合に実施でき、好ましくは、0から20℃において実施される。

本発明の従う、一般式VIIのシクロペンテン誘導体の、下記の式の(1R, 4S)-または(1S, 4R)-1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテン

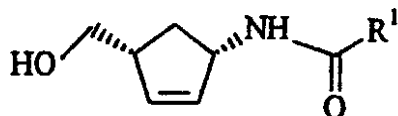


I

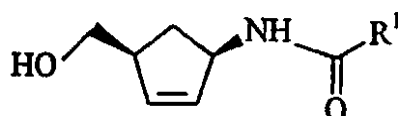


II

への転化は、微生物またはそれから抽出した酵素を手段としてもよいし、ペニシリンGアシラーゼを手段としてもよいし、また、N-アセチルアミノアルコールヒドロラーゼ活性を有する酵素を手段としてもよい。このバイオ変換は、上記の式IおよびIIの(1R, 4S) - または (1S, 4R) - 1-アミノ-4-(ヒドロキシメチル)-2-シクロペンテンをもたらし(適切であればそれを単離する)だけでなく、下記の一般式の(1S, 4R) - または (1R, 4S) - アミノアルコール誘導体



III



IV

(式中、 R^1 は上記した意味を有する)

をも与える。後者の物質も、適切であれば同様に単離する。

一般式VIIのシクロペンテン誘導体を、唯一の窒素源として、唯一の炭素源として、または唯一の窒素源および炭素源として資化することのできる、すべての微生物が、本発明に適する。バイオ変換は、シクロペンテン誘導体の(1R, 4S) - 異性体を唯一の窒素源として、唯一の炭素源として、または唯一の窒素源および炭素源として資化することのできる微生物を用いて、好都合に実施することができる。

このバイオ変換は、好ましくは、アルカリゲネス/ボルデテラ、ロドコッカス、アースロバクター、アルカリゲネス、アグロバクテリウム/リゾビウム、バチルス、シュードモナスまたはゴールドナ属から選んだ微生物、とりわけ、アルカリゲネス/ボルデテラ FB 188 (DSM 11172)、ロドコッカス・エリスロポリス CB 101 (DSM 10686)、アースロバクター sp. HSZ 5 (DSM 10328)、ロドコッカス sp. FP 387 (DSM 11291)、アルカリゲネス・キシロソキシダンス ssp. デニトリフィカンス HSZ 17 (DSM 10329)、アグロバクテリウム/リゾビウム HSZ 30、バチルス・シンプレックス K2、シュードモナス・プチダ K32、またはゴールドナ sp. (DSM 19687)、またはこれらの機能的に等価な変異種または突然変異種を使用して行なう。これらの微生物は、すでに述べたように、ブダペスト条約に従って寄託済みである。

本発明の方法によってきわめて適当な微生物の種は、アルカリゲネス/ボルデテラ FB 188 (DSM 11172)、ロドコッカス・エリスロポリス CB 101 (DSM 10686) およびゴールドナ sp. (DSM 10687) である。

バイオ変換は、これらの微生物の常法に従った当初の培養の後、静止状態の細胞（もはや炭素源もエネルギー源も要求しない、非成長細胞）を用いて、または成長している細胞を用いて、行なうことができる。バイオ変換は、好ましくは静止状態の細胞を用いて行なう。

本発明の方法によって好適な酵素であるN-アセチルアミノアルコールヒドロラーゼは、上述した方法により得ることができ、かつすでに上述した特性を有する。

適切なペニシリンGアシラーゼは、多種類の微生物たとえば、バクテリアまたはアクチノミセテス actinomycetes から得ることができる。とくに、下記の微生物から得ることができる：エシェリチア・コリ Escherichia coli ATCC 9637、バチルス・メガテリウム Bacillus megaterium、ストレプトミセス・ラベンデュリ Streptomyces lavendulae ATCC 13664、ノカルディア sp. ATCC 13635、プロビデンシア・レットゲリ Providencia rettgeri ATCC 9918、アースロバクター・ビスコスス Arthrobacter viscosus ATCC 15294、ロドコッカス・ファシアンス Rhodococcus fascians ATCC 12975、ストレプトミセス・フェオクロモゲネス Streptomyces phaeochromogenes ATCC 21289、アクロモバクター Achromobacter ATCC 23584 およびマイクロコッカス・ロゼウス Micrococcus roseus ATCC 416 である。市場で入手できるペニシリンGアシラーゼ、とくにエシェリチア・コリから得たペニシリンGアシラーゼ

EC 3. 5. 1. 11 (ベーリンガー・マンハイム)、またはバチルス・メガテリウムから得たものが使用できる。

固定化したペニシリンGアシラーゼは、好ましい態様において使用される。

バイオ変換は、当業技術において通常の媒体、たとえば、低モル濃度のリン酸塩、クエン酸塩またはヘパースHepes緩衝溶液の中で、水の中で、完全培地たとえば栄養イーストブロスNutrient Yeast Broth (N Y B) または表に示したその中で行なうことができる。このバイオ変換は、好ましくは表1に示した培地または低モル濃度のリン酸緩衝液を使用して実施する。

本発明のバイオ変換は、シクロペンテン誘導体(式VII)を、1回で添加しても実施できるし、連続的に添加して濃度が重量で10%、好ましくは2%を超えないようにして、好都合に実施することができる。

10

バイオ変換の間、pHは、5ないし9の範囲、好ましくは6ないし8の範囲とすることができる。このバイオ変換は、温度20ないし40℃、好ましくは25ないし30℃で、好都合に実施できる。

(1S, 4R) - 1 - アミノ - 4 - (ヒドロキシメチル) - 2 - シクロペンテンがバイオ変換の間に生成するときは、これを、酸たとえば塩酸を用いた酸加水分解により、(1R, 4S) - 1 - アミノ - 4 - (ヒドロキシメチル) - 2 - シクロペンテンに転化させることができる。

[実施例1]

(±) - 2 - アセチル - 2 - アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト - 5 - エン - 3 - オンの製造

20

(±) - 2 - アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト - 5 - エン - 3 - オンの100gを、アセトニトリル(800ml)およびピリジン(161. 26ml)中に、窒素ガス雰囲気下で溶解した。12℃において、アセチルクロライド104. 5gを、2時間を費やしてこの溶液に滴下した。ついで混合物を室温で4. 5時間攪拌した。混合物に水800mlを添加し、アセトニトリルを、真空下に蒸発させた。水性相を3回、酢酸エチル400mlで抽出した。一体にした有機相を1N-HCl(400ml)、水(400ml)、飽和NaCl(400ml)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して、完全に蒸発させた。残渣をメチレンクロライドに取り、シリカゲルで濾過した。濾液を濃縮し、生成物を蒸留により精製した。製品107. 76gが、透明な液体として得られた。収率は71%であった。

30

沸点(0. 07Torr): 51℃

¹H NMR(CDCl₃): δ [ppm] 2.25 (AB syst., 2H);

400MHz 2.8 (s, 3H);

3.42 (m, 1H);

5.30 (m, 1H);

6.89 (m, 1H);

6.92 (m, 1H).

40

[実施例2]

(±) - 2 - ブチリル - 2 - アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト - 5 - エン - 3 - オンの製造

(±) - 2 - アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト - 5 - エン - 3 - オンの100. 3gを、アセトニトリル(720ml)およびピリジン(142ml)中に、窒素ガス雰囲気下で溶解した。12℃において、ブチリルクロライド141. 8gを、1時間を費やしてこの溶液に滴下した。ついで混合物を室温で3時間攪拌した。混合物に、水720mlを添加した。アセトニトリルを真空下に蒸発させ、水性相を3回、酢酸エチル(300ml)で抽出した。一体にした有機相を1N-HCl(350ml)、飽和NaCl(400ml)および水

50

(500ml)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して、完全に蒸発させた。生成物を蒸留により精製した。製品107.76gが、透明な液体として得られた。収率は85%であった。

沸点(0.05Torr): 70°C

^1H NMR (CDCl_3): δ [ppm] 0.98 (t, $J=8.5\text{Hz}$, 3H);

400MHz 1.58-1.65 (2H);

2.23 (AB syst., 2H);

2.82-2.90 (2H);

3.42 (m, 1H);

5.30 (m, 1H);

6.62 (m, 1H);

6.90 (m, 1H).

10

[実施例3]

(±)-2-フェニルアセチル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンの製造

20

(±)-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンの33.4gを、アセトニトリル(240ml)およびピリジン(48.3ml)中に窒素ガス雰囲気下に溶解した。12°Cにおいて、フェニルアセチルクロライド68.6gを、30分間を費やしてこの溶液に滴下した。ついで混合物を室温で3.5時間攪拌した。混合物に水240mlを添加した。アセトニトリルを真空下に蒸発させ、水性相を3回、酢酸エチル(150ml)で抽出した。一体にした有機相を、1N-HCl(150ml)、飽和NaCl(150ml)および水(150ml)で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して、完全に蒸発させた。粗生成物をシリカゲルで濾過した(ヘキサン:酢酸エチル=1:1)。粗製品68.34gが、黄色い液体として得られた。

[実施例4]

30

(±)-2-プロピオニル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンの製造

(±)-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンの47gを、アセトニトリル(325ml)およびピリジン(41ml)中に、窒素ガス雰囲気下に溶解した。12°Cにおいて、プロピオニルクロライド43.9gを、1時間を費やしてこの溶液に滴下した。ついで混合物を、室温で5時間攪拌した。混合物に水145mlを添加し、アセトニトリルを真空下に蒸発させた。水性相を3回、酢酸エチル115mlで抽出した。一体にした有機相を、1N-HCl(140ml)、飽和NaHCO₃(40ml)溶液およびNaCl(40ml)溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して、完全に蒸発させた。残留物を蒸留により生成した。表題化合物55.8gが得られ、放置したところ固化した。収率は81.6%であった。

40

2.8mbarにおける沸点: 75-80°C

融点: 54-56°C

^1H NMR (DMSO-d_6): δ [ppm] 0.95 (t, 3H);
 4 0 0 MHz 2.10 (quart., 1H);
 2.28 (quart., 1H);
 2.64 (m, 2H);
 3.42 (s, 1H);
 5.16 (s, 1H);
 6.78 (m, 1H);
 6.96 (m, 1H).

10

[実施例 5]

(±)-2-イソブチリル-2-アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト-5-エン-3-オンの製造

(±)-2-アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト-5-エン-3-オンの 45. 1 g を、アセトニトリル (310 ml) およびピリジン (39 ml) 中に、窒素ガス雰囲気下に溶解した。10 °C において、イソブチリルクロライド 54. 1 g を、1 時間を費やしてこの溶液に滴下した。ついで混合物を室温で 5 時間攪拌した。混合物に水 140 ml を添加し、アセトニトリルを真空下に蒸発させた。水性相を、4 × 120 ml の酢酸エチルで抽出した。一体にした有機相を、1 N-HCl (50 ml)、飽和 NaHCO₃ (50 ml) 溶液および NaCl (50 ml) 溶液で洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥して、完全に蒸発させた。残留物を、活性炭とともに、n-ヘキサン (240 ml) 中で還流下に沸騰させた。活性炭を濾過して分離したのち、濾液を 0 °C に冷却し、表題化合物を濾過して取得した。54. 5 g の製品がえられた。収率は 76 % であった。

20

融点: 41 - 42 °C

^1H NMR (DMSO-d_6): δ [ppm] 0.92 (d, 3H);
 4 0 0 MHz 1.06 (d, 3H);
 2.10 (m, 1H);
 2.28 (m, 1H);
 3.40 (m, 1H);
 5.16 (s, 1H);
 6.78 (m, 1H);
 7.92 (m, 1H).

30

40

[実施例 6]

(±)-2-クロロアセチル-2-アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト-5-エン-3-オンの製造

(±)-2-アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト-5-エン-3-オンの 10. 1 g を、ジクロロメタン (10 ml)、ピリジン (8. 4 ml) および 4-N, N-ジメチルアミノピリジンの 0. 22 g の混合物中に、窒素ガス雰囲気下に溶解した。クロロアセチルクロライド 13. 5 g を、1 時間を費やしてこの溶液に滴下した。温度は 44 °C に上昇した。ついで混合物を、室温でさらに 2 時間攪拌した。混合物に水 100 ml を添加した。相分離ののち、水性相を 100 ml のジクロロメタンで抽出した。一体にした有機相を、硫酸ナトリウムで乾燥して、完全に蒸発させた。残留物を、活性炭 1 g とともに、ジイソプロピルエ

50

ーテル 100 ml 中で還流下に 10 分間沸騰させた。熱時濾過して得た濾液を室温に冷却し、固体を濾過して分離したのち、乾燥した。表題化合物 10.35 g が得られた。収率は 60% であった。

融点： 86 – 88 °C

¹H NMR (CDCl₃): δ [ppm] 2.28 (d, 1H);
400 MHz 2.40 (d, 1H);
 3.48 (s, 1H);
 4.56 (d, 2H);
 5.30 (s, 1H);
 6.70 (d, 1H);
 6.94 (m, 1H).

10

[実施例 7]

(±) – 2 – アセチルアミノ – 4 – ヒドロキシメチル – 2 – シクロペンテンの製造

(±) – 2 – アセチル – 2 – アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト – 5 – エン – 3 – オンの 79.56 g を、エタノール (450 ml) 中に、窒素ガス下に溶解し、– 10 °C に冷却した。ナトリウムボロハイドライド 19.8 g を分割して、45 分間を費やして、この溶液に滴下した。

20

混合物を 0 °C で 3 時間攪拌し、ついで濃硫酸を用いて、pH を 1.8 に調整した。酢酸エチル (200 ml) をこの混合物に添加し、固体分を濾過分離した。ついで、完全に蒸発させた。残渣を水に取り、メチレンクロライドで洗浄し、完全に蒸発させた。粗生成物を、酢酸エチル/メタノール 5 : 1 を溶媒として用いたシリカゲル濾過により精製した。濾液を濃縮した。51.83 g の生成物が、白色固体として得られた。収率は、使用した 2 – アセチル – 2 – アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト – 5 – エン – 3 – オン基準で、64% であった。

融点： 91 – 93 °C

30

¹H NMR (DMSO-d₆): δ [ppm] 1.18 (m, 1H);
400 MHz 1.78 (s, 3H);
 2.29 (m, 1H);
 2.66 (m, 1H);
 3.35 (s, 2H);
 4.58 (s, 1H);
 4.72 (m, 1H);
 5.61 (d, 1H);
 5.85 (d, 1H);
 7.83 (d, 1H).

40

[実施例 8]

(±) – 1 – ブチリルアミノ – 4 – ヒドロキシメチル – 2 – シクロペンテンの製造

(±) – 2 – ブチリル – 2 – アザビシクロ [2. 2. 1] ヘプト – 5 – エン – 3 – オンの

50

73.87 gを、エタノール(400 ml)中に、窒素ガス雰囲気下に溶解し、 -10°C に冷却した。ナトリウムボロハイドライド15.68 gを、分割して、45分間を費やしてこの溶液に滴下した。混合物を 0°C で3時間攪拌し、ついで濃硫酸を用いてpHを1.5に調整した。酢酸エチル(200 ml)をこの混合物に添加し、固体分を濾過分離した。ついで完全に蒸発させた。残渣を水に取り、メチレンクロライドで洗浄し、完全に蒸発させ他のち、高真空下に乾燥した。60.55 gの生成物が得られた。収率は、使用した(±)-2-ブチル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オン基準で、80%であった。

融点： $71-72^{\circ}\text{C}$

^1H NMR (CDCl_3): δ [ppm] 0.98 (t, $J=8.5\text{Hz}$, 3H);

10

400 MHz 1.40-1.50 (1H);

1.58-1.68 (2H);

2.10-2.18 (2H);

2.42-2.55 (1H);

2.85 (m, 1H);

3.62 (AB syst., 2H);

20

4.98 (m, 1H);

5.78-5.82 (2H);

6.38 (m, 1H).

[実施例9]

(±)-1-フェニルアセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンの製造

(±)-2-フェニルアセチル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンの67 gを、エタノール(450 ml)中に、窒素ガス雰囲気下に溶解し、 -10°C に冷却した。ナトリウムボロハイドライド13.2 gを、分割して、1時間を費やしてこの溶液に滴下した。混合物を室温で3.5時間攪拌したのち、濃硫酸を用いて、pHを3.8に調整した。ついで完全に蒸発させた。残渣を乾燥したのち、シリカゲル濾過(ヘキサン：酢酸エチル=1：9)により精製した。酢酸エチルからの再結晶の後、54.6 gの白色固体が得られた。収率は、使用した(±)-2-フェニルアセチル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オン基準で、80%であった。

30

^1H NMR (CDCl_3): δ [ppm] 1.28-1.35 (1H);
 4 0 0 MHz 1.40 (m, 1H);
 2.38-2.45 (1H);
 2.79 (m, 1H);
 3.50 (AB syst., 2H);
 3.52 (s, 3H);
 4.98 (m, 1H);
 5.75 (m, 2H);
 5.98 (m, 1H);
 7.20-7.38 (5H).

[実施例 10]

(±)-1-BOC-アミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンの製造
 (±)-1-アミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンハイドロクロライドの
 15 g を、水 150 ml とジオキサン 150 ml との混合溶媒中に、室温で窒素ガス雰囲気下
 に溶解した。溶液の pH を 1 N-NaOH で 14 に調整し、tert-ブチロキシカルボニル
 フルオライド (BOC-F, 20% 過剰) のジエチルエーテル溶液を加え、混合物をさら
 に 3 時間室温で攪拌した。(BOC-F は、Synthesis 1975, 599 に従って用意した。) pH
 を、濃 HCl で 2 に調節した。有機溶媒を蒸留除去し、残渣に水 50 ml を加えてから
 、混合物を 3 × 100 ml の酢酸エチルで抽出した。一体にした有機相を完全に蒸発させ
 した。残渣を、ジイソプロピルエーテル 110 ml と n-ヘキサン 80 ml との混合物から再結晶
 させた。表題化合物 11.95 g が得られた。収率は 56% であった。

融点: 68-70 °C

^1H NMR (DMSO-d_6): δ [ppm] 1.18 (m, 1H);
 4 0 0 MHz 1.38 (s, 9H);
 2.26 (m, 1H);
 2.65 (m, 1H);
 3.33 (t, 2H);
 4.45 (m, 1H);
 4.55 (t, 1H);
 5.62 (m, 1H);
 5.79 (m, 1H);
 6.73 (d, 1H).

[実施例 11]

(±)-1-プロピオニルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンの製造
 (±)-2-プロピオニル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オ
 ンの 16.6 g を、水 (140 ml) と 2-ブタノール (66 ml) との混合溶媒中に、窒素
 ガス雰囲気下で溶解し、-5 °C に冷却した。3 g のナトリウムボロハイドライドを、分割

して2時間にわたって添加した。混合物を10℃で2.5時間で攪拌し、ついで、濃塩酸と水との混合物(1:1)で、pHを2.2に調節した。溶液を40gになるまで蒸発させ、2N-NaOHでpHを6.2に調節した。混合物を5×50mlのジクロロメタンで抽出した。一体にした有機相を完全に蒸発させ、残渣を、トルエン(150ml)から再結晶させた。表題化合物11.1gが得られた。収率は65%であった。

融点: 67-68℃

¹H NMR (DMSO-d₆): δ [ppm] 0.96 (t, 3H);

400 MHz

1.16 (quint., 1H);

2.04 (quart., 2H);

2.26 (m, 1H);

2.66 (m, 1H);

3.34 (m, 2H);

4.58 (t, 1H);

4.72 (m, 1H);

5.61 (m, 1H);

5.84 (m, 1H);

7.72 (d, 1H).

[実施例12]

(±)-1-イソブチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンの製造
(±)-2-イソブチル-2-アザビシクロ[2.2.1]ヘプト-5-エン-3-オンの9gを、水(32ml)と2-ブタノール(84ml)との混合溶媒中に、窒素ガス雰囲気下に溶解し、0℃に冷却した。ナトリウムボロハイドライド1.37gを、分割して3.5時間にわたって添加した。混合物を3時間、20℃で攪拌し、ついで濃塩酸と水との混合物(1:1)でpHを2.5に調節したのち、2N-NaOHで中和した。溶液を40gになるまで蒸発させた。濃縮液を、3×80mlのジクロロメタンで抽出した。一体にした有機相を完全に蒸発させた。その結果生じた固体を、トルエン25mlから再結晶させた。表題化合物6.8gが得られた。収率は73.6%であった。

融点: 80-81℃

10

20

30

^1H NMR (DMSO- d_6): δ [ppm] 0.98 (d, 6H);
 400 MHz 1.16 (quint., 1H);
 2.30 (m, 2H);
 2.68 (m, 1H);
 3.32 (t, 2H);
 4.58 (t, 1H);
 4.70 (m, 1H);
 5.61 (m, 1H);
 5.82 (m, 1H);
 7.68 (d, 1H).

10

[実施例 13]

ペニシリンGアシラーゼを使用した (1R, 4S) - 1-アミノ-4- (ヒドロキシメチル) - 2-シクロペンテンの製造

E. coli から得たペニシリンGアシラーゼ EC 3. 5. 1. 11 (ベーリンガー・マンハイム) 165U (単位) / g またはバチルス・メガテリウムから得たペニシリンGアシラーゼ EC 3. 5. 1. 11 を、バイオ変換に使用した。

20

この目的で、50 mM のリン酸ナトリウム緩衝溶液 (pH 5-9, 4 ml) に 1-フェニルアセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンの非ラセミ体を 1 重量%、適切なペニシリンGアシラーゼ 400 mg を、37°C で接種した。

所定の時間間隔でサンプルを採取し、薄層クロマトグラフィー (シリカゲル 60、ブタノール: 水: 氷酢酸 = 3: 1: 1、ニンヒドリンで検出)、ガスクロマトグラフィー (キャピラリーカラム、HP-5、5% フェニルメチルシロキサン) または HPLC により分析した。酵素が、フェニルアセチル基を高い活性をもって除去し、それによって 40% までの対応するアミノアルコールを放出した。遊離のアミノアルコールが、80% の ee をも

30

[実施例 14]

微生物を使用した (1R, 4S) - 1-アミノ-4- (ヒドロキシメチル) - 2-シクロペンテンの製造

14. 1

ヴィスプにある ARA 水処理プラントから得た下水汚泥 (20%) を、1-アセチル-、1-プロピオニル-、1-イソブチリル-、または 1-ブチリルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを 0. 5 重量% 含有する A+N 培地 (表 1 を参照) に接種して、37°C において、振とうしながら培養した。(1R, 4S) - 1-アミノ-4- (ヒドロキシメチル) - 2-シクロペンテンの生成を、薄層クロマトグラフィーにより確認した。

40

14. 2

上記のようにして単離した微生物を、1-アセチル-、1-プロピオニル-、1-イソブチリル-、または 1-ブチリルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを 0. 5% 含有する培地 (表 1) で培養した。微生物は、24 ないし 36 時間後に、光学密度 (OD) 2 ないし 3 に成長した。このようにして得た細胞を、成長の遅い指数関数相に

50

において収穫し、10 mMのリン酸塩緩衝液中で洗浄した。

これに続くバイオ変換を、1-アセチル-、1-イソブチリル-、または1-ブチリル-アミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを1重量%含有する50 mMリン酸塩緩衝液中 (pH4.5-9) で実施した。薄層クロマトグラフィーにより、基質の50%が加水分解されて (1R, 4S) -1-アミノ-4- (ヒドロキシメチル) -2-シクロペンテンになったことが見出された。HPLC分析により、ee値は80ないし93%であることが判明した。

基質として1-ブチリルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを使用したとき、バイオ変換の速度は、DSM10686株をA+N培地上で培養した場合は0.14 (g/l/h/OD)、1-ブチリルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを含有するNYB (栄養イーストブロス) 培地上で培養した場合は0.03 (g/l/h/OD) であった。

同じ変換を、DSM10687株を用い、基質 (1-ブチリルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン) 濃度200 mMで実施した場合、バイオ変換速度は0.161 (g/l/h/OD) であった。

表 1 A+N培地

MgCl ₂	0.4 g/l
CaCl ₂	0.014 g/l
FeCl ₃	0.8 mg/l
Na ₂ SO ₄	0.1 g/l
KH ₂ PO ₄	1 g/l
Na ₂ HPO ₄	2.5 g/l
NaCl	3 g/l
ビタミン溶液	1 ml/l
痕跡元素溶液	1 ml/l
pH	7.5

14.3

ロドコッカス・エリスロポリスDSM10686を、唯一の炭素および窒素源として酢酸アンモニウム (3 g/l) を加えた最小培地 (表2参照) 中、6リットルの発酵器を用いて、30℃において、細胞密度がOD₆₅₀ > 2.5となるまで培養した。細胞の成長の間、追加の炭素源として、50%酢酸を連続的に添加した。ついで、酵素活性を誘起するため、60 gの (+/-) -1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを添加し、培養をさらに数時間続けた。最後に、さらに40 gの (+/-) -1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンを添加し、さらに10時間、培養を続けた。バイオ変換の進行は、オンラインでHPLCにより追跡した。使用した基質ラセミ体基準での分析値が40%、ee値が85%に到達したとき、酸を加えることにより発酵を停止した。

表 2 培地組成

成 分	濃 度	
イーストエキス	0. 5 g / l	
ペプトンM66	0. 5 g / l	
KH_2PO_4	4. 0 g / l	
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0. 5 g / l	10
K_2SO_4	2. 0 g / l	
酢酸 NH_4	3. 0 g / l	
CaCl_2	0. 2 g / l	
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1. 0 g / l	
痕跡元素溶液（下記参照）	1. 5 ml / l	
PPG（ポリプロピレングリコール）	0. 1 g / l	20

痕跡元素溶液

KOH	15. 1 g / l	
$\text{EDTA} \cdot \text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	100. 0 g / l	
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9. 0 g / l	
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4. 0 g / l	
H_3BO_3	2. 7 g / l	30
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1. 8 g / l	
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1. 5 g / l	
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0. 18 g / l	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0. 27 g / l	

14. 4

実施例14. 3と同様にして、微生物アースロバクター sp. HSZ5（DSM10328）、ロドコッカス sp. FB387（DSM11291）、アルカリゲネス・キシロソキシダンス ssp. デニトリフィカンス HSZ17（DSM10329）、アグロバクテリウム／リゾビウム HSZ30、バチルス・シンプレックスK2およびシュードモナス・ブチダK32を、酢酸ナトリウム上、前記培地（表1）上で、1-アセチル-、1-プロピオニル-、1-イソブチリル-、または1-ブチリル-アミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン（以下「アミノアルコール」と略称）の存在下または不存在下に培養した。

アミノアルコールの存在下に培養した指数関数細胞に関して、下記の結果が得られた。（HPLC分析）

菌 株	速度 [mmol/OD.h]	e e / 転化率 [%]
HSZ5 (DSM10328)	0.05	88.7 / 16
HSZ17 (DSM10329)	0.005	95 / 23
K32	0.05	54 / 1
CB101 (DSM10686)	0.1	84 / 39

菌株K2およびK17を培養し、収穫して、60時間のバイオ変換にかけた。

菌 株	速度 [mmol/OD.h]	e e / 転化率 [%]
K2	—	92 / 10
HS230	—	93 / 3.5

すべてのバッチから指数関数成長細胞および定常状態細胞を収穫し、バイオ変換の静止細胞として使用した。TLC分析の結果からは、アミノアルコールで誘導した細胞と、誘導しなかった細胞との間に、差異は認められなかった。

[実施例15]

ロドコッカス・エリスロポリス CB101 (DSM10686) からのN-アセチルアミノアルコールヒドロラーゼの精製

酵素を、下記のようにして、分子量50kDにおいてSDS-PAGE (ファルマシア・ファストゲル、10-15%勾配) 蛋白質バンドが単一になるまで精製した。

ロドコッカス・エリスロポリス CB101 (DSM10686) の細胞を、50mMトリス緩衝溶液 (pH6.2) の中で洗い、光学密度OD_{650nm}が190になるまで濃縮した。最終濃縮物1mMおよびDNaseにフェニルメタンスルホニルフルオリド (PMSF) を添加した後、粗生成物を得るため、細胞をフレンチプレスで処理した。遠心分離を行なって、200mlの細胞を含まないエキストラクトを、蛋白質濃度4.8mg/mlで得た。細胞を含まないエキストラクト960mgを、ジチオスレイトール (DTT) 1mMを含有する50mMトリス緩衝溶液 (pH8.0) であらかじめ平衡にしておいた、ハイロードHiLoad26/10Q-セファロースSepharoseイオン交換クロマトグラフィーカラム (ファルマシア) に載せた。

カラムを同じ緩衝溶液で洗浄したのち、蛋白質を直線的な緩衝溶液勾配 (1500ml; 勾配は、DTTの1mMを含有する50mMトリス緩衝溶液 (pH8.0) - DTTの1mMおよび1M-NaClを含有する50mMトリス緩衝溶液 (pH7.0) である) で溶離した。酵素は、370および430mM-NaClの間、pH7.6において、カラムから溶出した。活性な画分を集め、9mlに濃縮した。蛋白質の含有量は41mgであった。

さらに精製するため、この蛋白質溶液を、50mMのNaClおよびDTTの1mMを含有する50mMトリス緩衝溶液であらかじめ平衡にしてある、ハイロード26/60スーパーデックスSuperdex 75ゲル濾過クロマトグラフィーカラム (ファルマシア) に載せた。活性な成分を一体にしたところ、全蛋白質含有量は10.9mgであった。

この蛋白質溶液を、DTTの1mMを含有する50mMトリス緩衝溶液 (pH8.5) であらかじめ平衡にしてある、モノMonoQHR5/5カラム (ファルマシア) に載せた。蛋白質を、DTTの1mMを含有する50mMトリス緩衝溶液 (pH8.5) - DTTの1mMおよび1M-NaClを含有する50mMトリス緩衝溶液 (pH8.5) という、直線的な勾配 (40ml) で溶離した。酵素は、390および440mM-NaClの間で溶出した。活性な画分は、蛋白質1.4mgを含んでいた。

最後の精製段階では、上記と同じ緩衝溶液で平衡にした、同じカラムを使用した。使用した溶離の勾配は、同じ緩衝溶液で、0-500mM-NaClおよびpH7.0-8.5とした。このようにして、430μgの純粋な酵素を得ることができた。

この酵素のN-末端配列が、プロテイン・ブロットから直接決定された。下記の20個のアミノ酸配列が得られた：Thr-Glu-Gln-Asn-Leu-His-Trp-Leu-Ser-Ala-Thr-Glu-Met-Ala-Ala-Ser-Val-Ala-Ser-Asn

この配列は、既知の蛋白質のいずれに対しても、同族関係を示さなかった。

[実施例16]

酵素の特性の決定

酵素の特性の決定を、精製した酵素と、細胞を含まないエキストラクトであって、セファデックスSephadex G-25カラム(PD-10, ファルマシア)を使用して脱塩したものの、両方について行なった。

細胞を含まないエキストラクト中の蛋白質濃度は7.3mg/mlであり、精製した酵素の中の蛋白質濃度は135μg/mlであった。この細胞を含まないエキストラクトに、PMSFは加えなかった。

10

16.1 Km測定

細胞を含まないエキストラクトについて、Km測定を行なった。pH7.0および温度30℃における反応のKmは、基質1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテンに関し、22.5mMであった。

16.2 最適pH

1-アセチルアミノ-4-ヒドロキシメチル-2-シクロペンテン(25mM)の加水分解に最適なpHを、精製した酵素および細胞を含まないエキストラクトについて、pH6.2-9.0のpH範囲において、下記の緩衝溶液中で決定した。

20

トリス緩衝溶液100mM pH9.0; 8.5; 8.0; 7.5; 7.0

クエン酸/リン酸緩衝溶液100mM pH7.0; 6.55; 6.2

活性は、24時間測定した。

反応の最適pHは、1R, 4Sおよび1S, 4Rエナンチオマーを製造する反応に関して、pH7.0からpH7.5の間にあった。

細胞を含まないエキストラクトの活性に対し最適なpHは、pH7.0であった。選択性は、しかし、pH6.0からpH7.0の間で、より高かった。

第1図は、ロドコッカス・エリスロポリスCB101(DSM10686)からのN-アセチルアミノアルコールハイドロラーゼ(細胞を含まないエキストラクト)の活性を、pHの関数として示す。

30

16.3 最適温度

実施例16.2に示した反応にとって最適な温度は、25ないし30℃であった。

第2図は、ロドコッカス・エリスロポリスCB101(DSM10686)からのN-アセチルアミノアルコールハイドロラーゼ(細胞を含まないエキストラクト)の活性を、温度の関数として示す。

塩基配列のリスト

(1) 一般的情報

(i) 出願人

(A) 名称: ロンザAG

(B) 町名: ミュンヘンシュタイナーシュトラッセ 38

40

(C) 市名: バーゼル

(E) 国名: スイス

(F) 郵便番号: 4002

(ii) 発明の名称: アミノアルコールの製造方法

(iii) 配列の数: 1

(iv) コンピューター読み取り可能なフォーム

(A) 媒体のタイプ: フロッピーディスク

(B) コンピューター: IBM PC互換機

(C) オペレーティング・システム: PC-DOS/MS-DOS

(D) ソフトウェア: パテントイン

50

リリース# 1. 0、バージョン# 1. 3 0 (E P O)

(2) 配列情報の I D 番号: 1

(i) 配列の特性

(A) 長さ: 20 アミノ酸

(B) タイプ: アミノ酸

(D) トポロジー: 未知

(ii) 分子のタイプ: たんぱく質

(iii) ハイポセチカル: なし

(iv) アンチセンス: なし

(v) 断片のタイプ: N-末端

(vi) 最初の起源:

(B) 菌株: ロドコッカス・エリスロポリス

(C) 個別/単離体: ロドコッカス・エリスロポリス C B 1 0 1

(xi) 配列の記述: 配列 I D 番号: 1

Thr Glu Gln Asn Leu His Trp Leu Ser Ala Thr Glu Met

1

5

10

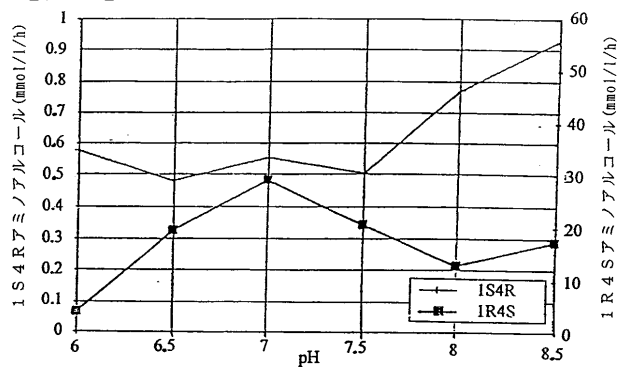
Ala Ala Ser Val Ala Ser Asn

15

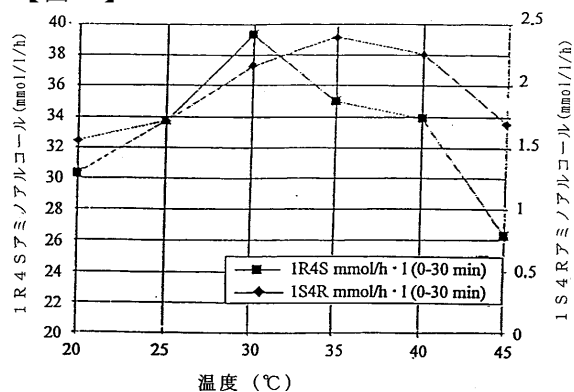
20

20

【図 1】



【図 2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 0 7 C 215/42	(2006.01)	C 0 7 C 215/42	
C 0 7 C 231/08	(2006.01)	C 0 7 C 231/08	
C 0 7 C 233/23	(2006.01)	C 0 7 C 233/23	
C 0 7 B 57/00	(2006.01)	C 0 7 B 57/00	3 6 0
		C 0 7 B 57/00	3 7 0

(31)優先権主張番号 908/97

(32)優先日 平成9年4月18日(1997.4.18)

(33)優先権主張国 スイス(CH)

(74)代理人 100075672

弁理士 峰 隆司

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034

弁理士 野河 信久

(74)代理人 100119976

弁理士 幸長 保次郎

(74)代理人 100153051

弁理士 河野 直樹

(74)代理人 100140176

弁理士 砂川 克

(74)代理人 100100952

弁理士 風間 鉄也

(74)代理人 100101812

弁理士 勝村 紘

(74)代理人 100070437

弁理士 河井 将次

(74)代理人 100124394

弁理士 佐藤 立志

(74)代理人 100112807

弁理士 岡田 貴志

(74)代理人 100111073

弁理士 堀内 美保子

(74)代理人 100134290

弁理士 竹内 将訓

(74)代理人 100127144

弁理士 市原 卓三

(74)代理人 100141933

弁理士 山下 元

(72)発明者 ベアネッガーエグリ, クリスチーネ

スイス国 ミュンスター CH-3985 バーンホフシュトラッセ (番地なし)

(72)発明者 バーチ, オルウェン M.

スイス国 ヴィスプ CH-3930 ヴァインガルテンヴェク 16

(72)発明者 ボサル, ピエール

- スイス国 オネックス CH-1213 アベニュー・ドゥ・グロシェヌ 31
 (72)発明者 フリーデン, ヴァルター
 スイス国 グリス CH-3902 グリントビールシュトラッセ 9
 (72)発明者 ブルックス, フランク
 スイス国 ラロン CH-3942 ハウス フォルメス (番地なし)
 (72)発明者 ブルグドルフ, クヌート
 スイス国 リート・ブリック CH-3911 リングヴァルム 23
 (72)発明者 デュク, ローラン
 スイス国 CH-3971 シェルミニヨン (番地なし)
 (72)発明者 エッター, ケーサラ
 スイス国 ニーダーガンペル CH-3945 オーベルドルフ (番地なし)
 (72)発明者 グッギスベルク, イヴ
 スイス国 シエール CH-3960 アヴェニュー ドゥ ロトーン 11

審査官 吉森 晃

- (56)参考文献 Expression of the *Arthrobacter viscosus* penicillin G acylase gene in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*., Appl Environ Microbiol. , 1989年, Vol. 55(6), p. 1351-1356
 Molecular cloning of the penicillin G acylase gene from *Arthrobacter viscosus*., Appl Environ Microbiol. , 1988年, Vol. 54(11), p. 2603-2607
 Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium* ATCC 14945., FEMS Microbiol Lett. , 1995年, Vol. 125(2-3), p. 287-292
 Nucleosides & Nucleotides, 1990年, Vol. 9(7), p. 875-884
 Purification and properties of ampicillin acylase from *Pseudomonas melanogenum*., Biochim Biophys Acta. , 1990年, Vol. 1040(1), p. 12-18
 Changing the substrate specificity of penicillin G acylase from *Kluyvera citrophila* through selective pressure., Biochem J. , 1994年, Vol. 303(Pt3), p. 869-875
 Molecular characterization of the 4-hydroxyphenylacetate catabolic pathway of *Escherichia coli* W: engineering a mobile aromatic degradative cluster., J Bacteriol. , 1996年 1月, Vol. 178(1), p. 111-120
 Expression and regulation of the penicillin G acylase gene from *Proteus rettgeri* cloned in *Escherichia coli*., J Bacteriol., 1986年, Vol. 168(1), p. 431-433

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12P 1/00 - 41/00
 C12N 9/80
 C12N 1/20
 C07B 57/00
 C07C213/02
 C07C215/42
 C07C231/08
 C07C233/23
 PubMed
 REGISTRY(STN)
 CASREACT(STN)
 JSTPlus(JDreamII)