



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 1/20, C12P 17/18, C07D 413/06, A01N 43/76, 63/02, A61K 31/42</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/06697</p> <p>(43) 国際公開日 2000年2月10日(10.02.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/04073</p> <p>(22) 国際出願日 1999年7月29日(29.07.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平10/215650 1998年7月30日(30.07.98) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.)[JP/JP] 〒541-0045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目1番1号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および</p> <p>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 猶塚昭彦(NAOTSUKA, Akihiko)[JP/JP] 〒662-0828 兵庫県西宮市門戸西町10番51号 Hyogo, (JP) 伊澤幹夫(IZAWA, Motoo)[JP/JP] 〒661-0002 兵庫県尼崎市塚口町1丁目22番1-502号 Hyogo, (JP) 宮川権一郎(MIYAGAWA, Ken-ichiro)[JP/JP] 〒563-0103 大阪府豊能郡豊能町東ときわ台6丁目6番の11 Osaka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 朝日奈忠夫, 外(ASAHI, Tadao et al.) 〒532-0024 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号 武田薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 AE, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GD, GE, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ZA, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING INDOLEMYCIN</p> <p>(54) 発明の名称 インドールマイシンの製造法</p> <p>(57) Abstract A microorganism capable of producing indolemycin and having a tryptophan analog-tolerance; and a process for efficiently producing indolemycin or its salt which comprises culturing this microorganism in a medium and then collecting the indolemycin or its salt thus produced and accumulated in the liquid culture.</p>		

(57)要約

インドールマイシン生産能を有し、トリプトファンアナログ耐性を有する微生物、および該微生物を培地で培養し、培養液中にインドールマイシンまたは、その塩を生成蓄積せしめ、これを採取することによりインドールマイシンまたはその塩を効率よく製造することができる。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー	ZA	南アフリカ共和国
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン				
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KR	韓国	PT	ポルトガル		
				RO	ルーマニア		

明 細 書

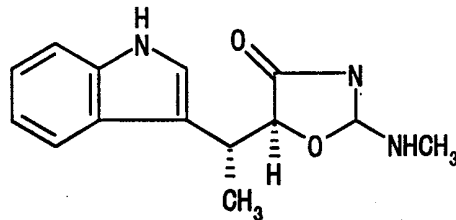
インドールマイシンの製造法

技術分野

- 5 本発明は、抗菌剤、特に抗ヘリコバクター・ピロリ (*Helicobacter pylori*) 剤として有用なインドールマイシンの、発酵法による製造法に関する。

背景技術

- 10 インドールマイシンは、次の構造式で表される化合物であり、医薬（例えば抗菌剤、特に抗ヘリコバクター・ピロリ剤）、動物薬、除草剤等として有用である。



- 15 化学的合成法によるインドールマイシンの製造法として、ジャーナル・オブ・オーガニック・ケミストリー (Journal of Organic Chemistry)、51巻、4920頁 (1986年) に記載の方法が知られている。しかし、インドールマイシンには2個の不斉炭素原子が存在するために、該合成法ではラセミ体としてしか得られていない。また、ケミストリー・レターズ (Chemistry Letters)、163頁 (1980年) に記載の方法も知られているが、インドールマイシンの光学活性体を得るために、煩雑な工程が必要となり、収率も低い。

- 20 インドールマイシンの製造法としては、ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) ATCC 12648を生産菌として用いる発酵製造法が知られている [ザ・ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS)、27巻、49頁 (1974年)、ザ・ジャーナル・オブ・アンチバイオティクス (THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS)、34巻、551頁 (1981年)] が、収量が低いため工業的製造法としては問題があった。

- 25 従来のインドールマイシンの製造方法では工業的製造には不十分であるため、インドールマイシンの大量かつ簡便な製造方法が望まれている。

発明の開示

本発明者らは、このような状況を鑑み、発酵法によるインドールマイシンの製造法を確立すべく種々検討を行った結果、ストレプトミセス・グリセウスのトリプトファンアナログ耐性変異株を取得し、これを用いることによつて、インドールマイシンがその培養液中に大量に蓄積することを見いだした。また、その培地中にL-トリプトファンを添加することにより、さらに蓄積量が増大することを見いだした。さらに、吸着樹脂、中塩基性陰イオン交換性樹脂、弱酸性陽イオン交換樹脂を担体とし、含水有機溶媒を用いるクロマトグラフィーを使用することにより、該培養液から簡便かつ高収率でインドールマイシンを取得する方法を確立した。

即ち、本発明は、

- (1) インドールマイシン生産能を有し、トリプトファンアナログ耐性を有する微生物、
- (2) 微生物がストレプトミセス属に属する微生物である上記(1)記載の微生物、
- (3) 微生物がストレプトミセス・グリセウスに属する微生物である上記(1)記載の微生物、
- (4) トリプトファンアナログがフルオロ-DL-トリプトファンである上記(1)記載の微生物、
- (5) 上記(1)記載の微生物を培地で培養し、培養液中にインドールマイシンまたはその塩を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするインドールマイシンまたはその塩の製造法、
- (6) 培地にL-トリプトファンを添加することを特徴とする上記(5)記載の製造法、
- (7) L-トリプトファンを培地1Lあたり0.2~5g添加することを特徴とする上記(5)記載の製造法、
- (8) アンスラニル酸を培地1Lあたり0.2~10g添加することを特徴とする上記(5)記載の製造法、

(9) 培地 1 L あたり L-トリプトファン 0.2 ~ 3 g および アンスラニル酸 0.2 ~ 2 g を添加することを特徴とする上記 (5) 記載の製造法、および

(10) 吸着樹脂、塩基性陰イオン交換性樹脂または/および酸性陽イオン交換樹脂を担体とし、含水有機溶媒を用いて溶出精製することを特徴とする上記 (5)

5 記載の製造法に関する。

本発明に用いられるトリプトファンアナログとしては、ハロゲン化トリプトファン、例えば 5-フルオロ-DL-トリプトファン (以下、5-FT と称することもある)、6-フルオロ-DL-トリプトファン (以下、6-FT と称することもある) 等のフルオロ-DL-トリプトファン等が挙げられる。特に好ましくは、5-フルオロ-DL-トリプトファンまたは 6-フルオロ-DL-トリプトファンが挙げられる。

トリプトファンアナログ耐性を有する微生物は、インドールマイシン生産能を有する微生物に、例えば微生物の育種において通常用いられる変異処理を施した後、上記トリプトファンアナログ含有培地で生育することのできる株を選択することにより取得することができる。該変異処理方法としては、例えば、(1) 紫外線照射による処理方法 [親株として使用するインドールマイシン生産能を有する微生物の胞子を、例えば、100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁し、これに 15 W の紫外線灯を、30 cm の距離から 90 秒照射する]、および、(2) N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: 以下、NTG と称することもある) などの薬剤で処理する方法 [NTG 処理: 親株として使用するインドールマイシン生産能を有する微生物の胞子を、例えば、NTG 1 mg/ml を含む 50 mM Tris·HCl 緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、30°C、1 時間放置する] などが挙げられる。

また、変異処理を行わなくても、いわゆる自然変異によって、上記トリプトファンアナログ含有培地で生育することのできる性質を獲得した株も、本発明におけるトリプトファンアナログ耐性を有する微生物に含まれる。

本発明に用いられるインドールマイシン生産能を有する微生物としては、インドールマイシン生産能を有する微生物であればいずれでもよく、例えばストレプト

トミセス (*Streptomyces*) 属に属する微生物 [例えばストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)]、具体的には、ストレプトミセス・グリセウス ATCC 12648、また、ストレプトミセス・エスピー (*Streptomyces* sp.) HC-21 (IFO 15984、FERM BP-5571) 等が挙げられる。なお、スト
5 レプトミセス・エスピー (*Streptomyces* sp.) HC-21 の菌学的性状は、WO 97/49703 に記載されている。

インドールマイシン生産能を有し、トリプトファンアナログ耐性を有する微生物は、例えば、ストレプトミセス・グリセウス ATCC 12648 等のインドール
10 マイシン生産菌を親株として、これに、紫外線照射、NTG 処理などの変異処理を施した後、親株の生育し得ない高い濃度の上記トリプトファンアナログを含有する培地 (寒天平板培地など) で培養を行い、生育するコロニーを選択分離することによって、トリプトファンアナログ耐性変異株として得ることができる。このようにして得られた変異株のトリプトファンアナログに対する耐性度は、例えば、次のように判定できる。例えば [表 1] に示す寒天平板培地に所定の量のト
15 リプトファンアナログ (例えば、5-フルオロ-DL-トリプトファンなど) を加え、1 ml 当たり約 1×10^6 ~ 約 1×10^8 個の胞子の懸濁液を一白金耳塗布し、親株の生育に適した条件 (例えば、24°C、8日間) のもとで培養し、親株が生育できる該トリプトファンアナログ濃度を測定する。本発明における「トリ
20 リプトファンアナログ耐性を有する微生物 (トリプトファンアナログ耐性株)」とは、親株が生育しない濃度のトリプトファンアナログを含有する培地 (例えば、寒天培地) で生育することが出来るようになった変異株である。

本発明におけるトリプトファンアナログ耐性を有する微生物としては、前記トリ
25 リプトファンアナログを高濃度含有する培地 (例えば、寒天平板培地) で生育することのできる微生物が挙げられる。例えば 5-フルオロ-DL-トリプトファンの場合、0.1 ~ 10000 μ g/ml、好ましくは 1 ~ 5000 μ g/ml、より好ましくは 10 ~ 2000 μ g/ml 含有する培地で生育することができる微生物が挙げられる。6-フルオロ-DL-トリプトファンの場合、50 ~ 1000 μ g/ml、好ましくは 100 ~ 800 μ g/ml 含有する培地で生育することができる微生物が挙げられる。

上記の方法で得られるトリプトファンアナログ耐性を有する微生物を培養し、培養液中のインドールマイシンを定量することによりインドールマイシンの蓄積量が増大した菌株を選択することができる。

- このようにして得られるインドールマイシン生産能を有しトリプトファンアナログ耐性を有する微生物の具体例としては、後述の実施例で得られた5-F T濃度10 μ g/mlで生育できるストレプトマイセス・グリセウス(*Streptomyces griseus*) 5FW-1-226-9、5-F T濃度2 mg/mlで生育できるストレプトマイセス・グリセウス5FW-2-8-7、6-F T濃度0.5 mg/mlで生育できるストレプトマイセス・グリセウス6FW-1-8-5などが挙げられる。
- 10 上記のストレプトマイセス・グリセウス5FW-1-226-9は、財団法人発酵研究所(IFO)に1998年3月27日から寄託番号IFO16170として、日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(NIBH, 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号)に1998年4月30日から寄託番号FERM BP-6336として寄託されている。
- 15 ストレプトマイセス・グリセウス5FW-2-8-7は、IFOに1998年3月27日から寄託番号IFO16171として、NIBHに1998年4月30日から寄託番号FERM BP-6337として寄託されている。
- ストレプトマイセス・グリセウス6FW-1-8-5は、IFOに1998年5月26日から寄託番号IFO16178として、NIBHに1998年6月
- 20 1日から寄託番号FERM BP-6381として寄託されている。
- また、ストレプトマイセス・エスピー(*Streptomyces* sp.) HC-21は、IFOに1996年6月12日から寄託番号IFO15984として、NIBHに1996年6月25日から寄託番号FERM BP-5571として寄託されている。
- 25 本発明の製造法は、該インドールマイシン生産能を有し、トリプトファンアナログ耐性を有する微生物を培地で培養し、該培養液中にインドールマイシンまたはその塩を生成蓄積せしめ、これを採取するものである。

該培養は、通常の静置培養、振とう培養、通気攪拌培養(例えばバッチ培養、フィード培養)のいずれの方法でもよい。大量の培養の際は通気攪拌培養が好

ましい。

また、微生物の生育および該微生物によるインドールマイシンの生産に適するレベルの溶存酸素濃度を保つために、必要に応じて、酸素を添加する通気攪拌培養を行うこともできる。

- 5 該培養に用いられる培地は、用いられる微生物が利用し得る栄養源を含むものなら、液状でも固状でもよいが、大量に処理するときには液体培地を用いるのがより適当である。

該培地には同化し得る炭素源、消化し得る窒素源、無機塩、微量栄養素等が適宜配合される。炭素源としては、例えばブドウ糖、乳糖、ショ糖、麦芽糖、デキストリン、でん粉、マニトール、ソルビトール、グリセロール、油脂類（例、大豆油、オリーブ油、ヌカ油、ごま油、ラード油、チキン油など）、各種脂肪酸（例、ラウリン酸、ミリスチン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸など）等が用いられる。窒素源としては、例えば肉エキス、酵母エキス、乾燥酵母、大豆粉、脱脂大豆粉、コーン・スチープ・リカー、ポリペプトン、ペプトン、綿実粉、
15 麩糖蜜、尿素、チオ尿素、アンモニア、アンモニウム塩類（例、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、硝酸アンモニウム、酢酸アンモニウムなど）等が用いられる。無機塩としてはナトリウム、カリウム、銅、カルシウム、マグネシウム、鉄、マンガン、亜鉛、コバルト、ニッケルなどの硫酸塩、塩酸塩、炭酸塩、硝酸塩、リン酸塩、酢酸塩、ホウ酸塩などが用いられる。微量栄養素としては、アミノ酸（例、グルタミン酸、アスパラギン酸、アラニン、リジン、バリン、メチオニン、
20 プロリン等）、ペプチド（例、ジペプチド、トリペプチド等）、ビタミン類（例、ビタミンB₁、ビタミンB₂、ニコチン酸、ビタミンB₁₂、ビタミンCおよびその誘導体など）、核酸類（例、プリン、ピリミジンおよびその誘導体など）等を生育や生産量を増大させる目的で添加することもできる。

- 25 その他、培地のpHを調節する目的で無機または有機の酸、アルカリ類等を加えてもよく、あるいは消泡剤として該微生物の生育に悪影響を与えない量の界面活性剤〔例えば、シリコンKM70（信越化学株式会社製）、アクトコール31-56（武田薬品工業株式会社製）等〕を添加することもできる。

培地のpHは約4~9、とりわけpH約5~8の範囲が好ましい。pHをこの

範囲に保つために、予め培地にリン酸緩衝液や炭酸カルシウムを加えておいてもよいし、培養中にpHが所定の値を下回った場合には、水酸化アルカリ、アンモニア水、アンモニアガス等を添加して、逆にpHが所定の値を上回った場合には、塩酸、硫酸等の鉱酸または酢酸、クエン酸等の有機酸を添加してpHを修正することもできる。

5 本発明における、インドールマイシン生産能を有し、トリプトファンアナログ耐性を有する微生物を培養する場合、インドールマイシン生産性を向上させるために、該培地にL-トリプトファンを0.01~1% (1Lあたり0.1~10g) 好ましくは0.02~0.5% (1Lあたり0.2~5g)、より好ましくは0.02~0.3% (1Lあたり0.2~3g) 添加することが好ましい。また同様の目的でアンスラニル酸を用いることができる。この場合には、該培地にアンスラニル酸を0.01~6% (1Lあたり0.1~60g) 好ましくは0.02~1% (1Lあたり0.2~10g)、より好ましくは0.02~0.2% (1Lあたり0.2~2g) を添加することが好ましい。

15 当然の事ながら、L-トリプトファンとアンスラニル酸は、それぞれ単独で用いることができるし、併せて該培地に添加して用いることもできる。

アンスラニル酸は、L-トリプトファンよりも安価であるが、しばしば生産菌の生育に阻害的である。

20 このためL-トリプトファンと併用するとしばしば好結果が得られることがある。この場合コスト的に好ましく、生育阻害が少なく、インドールマイシンの生産性が最大になるようにそれぞれの濃度を設定してやればよい。培地にL-トリプトファンおよびアンスラニル酸の双方を添加する場合には、これらの添加量はそれぞれ単独添加する場合に比べ少量でよく、1Lあたりの添加量はL-トリプトファンが0.01~0.5% (0.1~5g)、好ましくは0.02~0.3% (0.2~3g)、アンスラニル酸が0.02~1% (0.2~10g)、好ましくは0.02~0.2% (0.2~2g) である。

25 L-トリプトファンの培地への添加は、培養開始時に一括して加えてもよいし、培養中に一括もしくは分割して添加してもよい。アンスラニル酸は、生育に阻害的にならないように培養開始時および/または培養途中に分割して加えること

で好ましい結果が得られることがある。

培養の温度は、使用する菌株の生育ならびにインドールマイシンの菌体外蓄積に好適な温度（例えば、約10～40℃、例えば上記のストレプトマイセス・グリセウスおよびその変異株の場合は、約22～30℃、ストレプトマイセス・エスピー（*Streptomyces sp.*）HC-21およびその変異株の場合は、約18～28℃）である。

培養時間は、培養条件によって適宜選択すればよいが、単位培養液量あたりのインドールマイシンの蓄積量が最大に達するまで培養を継続すればよく、通常約2日～2週間である。

10 本発明製造法において、インドールマイシンは、主として培養上澄液に含まれる。従って、培養終了後の培養液を、自体公知の方法（例、遠心分離方法、フィルタープレス方法、限外ろ過やセラミックろ過器等によるろ過分離等）により、ろ液と菌体を分離し、得られたろ液からインドールマイシンを分離、精製するのがよい。この場合、必要に応じて事前に凝集剤を添加したり、加熱処理を行ってもよい。得られたろ液または上澄液からインドールマイシンを得るには、水と混合しない有機溶媒（例えば、酢酸エチル、イソブタノール、メチルイソブチルケトン等）を用いて抽出後濃縮する方法などの、脂溶性物質の精製に通常用いられる公知の方法によって精製することができる。

20 本発明においては、以下に述べる方法、即ち、吸着樹脂、塩基性陰イオン交換性樹脂または／および酸性陽イオン交換樹脂を担体とし、含水有機溶媒を用いて溶出精製することにより、インドールマイシンを高収率かつ安価に取得できる。

25 まず、得られたろ液をpH5～9で吸着樹脂〔例、ダイヤイオンHP-20、セパビーズSP-207、またはSP-850（三菱化学社製）、XAD-2（ローム・アンド・ハース社製、米国）、好ましくはセパビーズSP-850〕に通液し、インドールマイシンを吸着させる。これを、0.01～1M濃度のアルカリ溶液（例、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウム、アンモニア等）、0.01～1M濃度の酸（例、塩酸、硫酸、リン酸等）で洗浄する。その際、アルカリ溶液および酸による洗浄操作の順序は逆でもよく、また該操作を繰り返し行ってもよい。その後さらに、5～30%濃度の含水アルコール（例、メタノール、エタノール、

イソプロピルアルコール等)で洗浄した後、20～60%含水アルコールでインドールマイシンを溶出する。含水アルコールでの洗浄および溶出の操作は約30～50℃で行うことにより、溶出液量を少なくすることができる。

次に、塩基性陰イオン交換樹脂または/および酸性陽イオン交換樹脂を担体とし、上記の溶出液を通過精製する。

該塩基性陰イオン交換樹脂としては、たとえばダイヤイオンPA-412、PA-306、SA21AまたはWA-30(三菱化学社製)、アンバーライトIRA-402(ローム・アンド・ハース社製、米国)、ダウエックス1(ダウ・ケミカル社製、米国)等の他、たとえばアンバーライトIRA-67(ローム・アンド・ハース社製、米国)等の中塩基性イオン交換樹脂が挙げられるが、これらの中でも中塩基性イオン交換樹脂が好ましい。

該陽イオン交換樹脂としてはたとえばアンバーライトIR-120B、IR-200C(ローム・アンド・ハース社製、米国)、ダウエックス50W(ダウ・ケミカル社製、米国)、ダイヤイオンPK-216(三菱化学社製)等の他、たとえばアンバーライトIRC-50(ローム・アンド・ハース社製、米国)、レバチットCNP-80(バイエル社製、ドイツ)等の弱酸性陽イオン交換樹脂が挙げられるが、これらの中でも弱酸性陽イオン交換樹脂が好ましい。

上記の樹脂通過処理の他に活性炭〔例、クロマト用活性炭(武田薬品工業社製)〕処理などを適宜単独または組み合わせて、あるいは繰り返し行ってもよく、上述の含水アルコールで洗浄することが好ましい。

得られた通過液および洗浄液を減圧濃縮するとインドールマイシン結晶が得られる。その際に減圧濃縮液にアルコール(例、メタノール、エタノール、イソプロピルアルコール)を該濃縮液量に対して約20～50%添加すると得られる結晶の含量はさらに高くなる。必要に応じて含水アルコール(30～60%のメタノールあるいはエタノール)で再結晶し、さらに純度の高い精製結晶を得ることができる。

本発明で得られるインドールマイシンは、医薬(例えば抗菌剤、特に抗ヘリコバクター・ピロリ剤)、動物薬、除草剤等として有用である。

発明を実施するための最良の形態

以下に実施例をもって本発明をより具体的に説明するが、これらはいずれも本発明の範囲を限定するものではない。

- 5 培地中の%は、W/V%を意味するものとする。

実施例

実施例 1

10 ストレプトミセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) ATCC 12648
にUV処理 (15Wの紫外線灯を、30cmの距離から90秒照射) を行い、イン
ドールマイシン高生産変異株ストレプトミセス・グリセウスRS-1-67-7株
を得た。このRS-1-67-7株に常法に従いN-メチル-N'-ニトロ-N-ニ
トロソグアニジン処理 [以下NTG処理と称する: 胞子を、NTG 1mg/ml
15 を含む50mM Tris・HCl緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、30℃、1時間放
置] を行った後、5-フルオロ-DL-トリプトファン 10μg/mlを含有す
る [表1] に示す平板寒天培地上に塗抹して、24℃、7日間培養した。該寒天
培地上に生育したコロニーの中からインドールマイシン高生産変異株として、ス
トレプトミセス・グリセウス 5FW-1-226-9を選択した。 [表2] で示す
寒天斜面培地上で生育させた 5FW-1-226-9株を [表3] に示す種培地
20 20mlを含む200ml容三角フラスコに一白金耳を接種し、24℃、48時
間振とう培養し、その0.5mLを [表4] に示す主発酵培地20mlを含む20
0ml容三角フラスコに接種し、回転式振とう機上で、24℃、6日間培養した。
培養終了後の5FW-1-226-9株の該培養液中のインドールマイシン蓄積
量を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定したところ、生産量は24
25 0μg/mlであった。

親株であるRS-1-67-7株を、同様の方法で培養したところ、生産量は
130μg/mlであった。即ち、5-F T耐性を付与することにより生産性が
1.8倍に上昇していることがわかる。

実施例 2

0.05% L-トリプトファンを添加した〔表4〕に示す主培地を用い、5FW-1-226-9株を実施例1と同じ条件で培養した。

培養終了後の培養液中のインドールマイシン生産量を測ったところ、トリプトファン無添加で培養した場合が、 $240 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった（実施例1）のに対し、L-トリプトファンを0.05%添加した場合、インドールマイシン生産量は $320 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。即ち、L-トリプトファン0.05%の添加により更に1.5倍の生産性上昇が認められた。

これに対し、親株であるRS-1-67-7株を同一条件で培養したところ、生成したインドールマイシンは、L-トリプトファン無添加の場合 $130 \mu\text{g}/\text{ml}$ であり、L-トリプトファンを添加した場合が $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

実施例 3

ストレプトミセス・グリセウス 5FW-1-226-9株に、実施例1と同様にしてNTG処理を施した後、5-フルオロ-DL-トリプトファン $2 \text{mg}/\text{ml}$ 含有する〔表1〕に示す寒天平板培地上で生育できるインドールマイシン高生産変異株として、ストレプトミセス・グリセウス 5FW-2-8-7を得た。

この5FW-2-8-7株を〔表2〕に示すスラント培地上で生育させ、〔表5〕に示す種培地 20ml を含む 200ml 容三角フラスコに一白金耳を接種し、 24°C 、48時間振とう培養し、その培養液の 0.5ml を〔表6〕に示す主発酵培地 20ml を含む 200ml 容三角フラスコに接種し、回転式振とう機上で、 24°C 、8日間培養した。培養終了後の該培養液中のインドールマイシン蓄積量をHPLCで測ったところ、 $557 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

親株の5FW-1-226-9株を同様の条件で培養したところ、そのインドールマイシン生産量は $325 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

また〔表6〕に示す主培地に0.05%のL-トリプトファンを添加し、上記と同一条件で培養したところ、5FW-2-8-7株は、 $1029 \mu\text{g}/\text{ml}$ のインドールマイシンを培養液に蓄積していた。

実施例 4

ストレプトミセス・グリセウス 5FW-2-8-7株に、実施例1と同様にして NTG処理を施した後、6-フルオロ-DL-トリプトファン 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 含有する〔表1〕に示す寒天平板培地上に塗布して、24 $^{\circ}\text{C}$ 、7日間培養した。該寒天平板培地上に生育したコロニーの中からインドールマイシン高生産変異株として、ストレプトミセス・グリセウス 6FW-1-8-5株を得た。この6FW-1-8-5株を〔表2〕に示す寒天斜面培地上で生育させ、〔表7〕に示す種培地20mlを含む200ml容三角フラスコに一白金耳を接種し、24 $^{\circ}\text{C}$ 、48時間振とう培養し、その培養液の0.5mlを〔表8〕に示す主発酵培地20mlを含む200ml容三角フラスコに接種し、回転式振とう機上で、24 $^{\circ}\text{C}$ 、11日間培養した。培養終了後の該培養液中のインドールマイシン蓄積量をHPLCで測定したところ、生産量は1335 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

親株の5FW-2-8-7株を同様の条件で培養したところ、そのインドールマイシン生産量は827 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。

実施例5

15 ストレプトミセス・グリセウス 5FW-2-8-7の凍結保存菌1mlを〔表9〕に示す前培養培地500mlを含む2.0L容坂口フラスコに接種し、28 $^{\circ}\text{C}$ 、48時間振とう培養した。その500mlを〔表10〕に示す種培養培地120Lを含む200L発酵槽で24 $^{\circ}\text{C}$ 、通気120L/min、タンク内圧1kg/cm²、攪拌150rpm下で、48時間培養し、その全量を、〔表11〕に示す主培養培地4m³を含む6m³発酵槽に移植し、24 $^{\circ}\text{C}$ で培養した。培養24時間目にL-トリプトファン0.05%となるように添加し、更に通気3200L/min、タンク内圧1kg/cm²下で、溶存酸素の下限が5ppmを切らないように攪拌を80から115rpmへ変化させて通気攪拌培養を162時間行ったところ、培養液に840 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のインドールマイシンが蓄積していた。

25 実施例6

実施例5で得られた培養終了液(3800L)に水道水1500Lを加え、60 $^{\circ}\text{C}$ に加温し、硫酸でpHを5.0に調整した後、トプコパーライトNo.31(東興パーライト工業社製)150kg、0.2%サンフロックC-109P(三洋化成社製)800Lを加え、予めラジオライト600及び500S(昭和化学工業社

製) をそれぞれ 80、20 kg プレコートしたオリバーろ過機でろ過し、ろ液を得た。該ろ液を NaOH で pH 8.0 に調整した後、セパビーズ SP-850 (三菱化学株式会社製) 75 L に通液、水 350 L、0.1 mol/L 水酸化ナトリウム水 225 L、水 225 L、0.1 mol/L 硫酸 75 L、水 300 L、20% イソプロピルアルコール水 225 L でそれぞれ洗浄後、50% イソプロピルアルコール 300 L で溶出し、インドールマイシンを含む区分 243 L を得た。予め 50% イソプロピルアルコールで置換した IRA-67 (OH型) 35 L、CNP-80 (H型) 10 L、活性炭 (PAL-P) 4 L を直列に連結しインドールマイシンを含む区分を通過後、50% イソプロピルアルコールで洗浄し、通過・洗浄液 392 L を得た。NaOH で pH を 5.0 に調整した後 42 L まで濃縮し、メタノール 14 L を添加後、NaOH で pH 6.0 に調整、晶出させ、粗結晶 2.6 kg を得た。メタノール 13 L に溶解し上水 13 L を加え再結晶し、インドールマイシンを 99% 以上含む精結晶 2.3 kg を得た。

実施例 7

15 ストレプトミセス グリセウス 6FW-1-8-5 の凍結保存菌 1 ml を [表 9] に示す前培養培地 500 ml を含む 2.0 L 容坂口フラスコに接種し 28℃、48 時間振とう培養した。その 500 ml を [表 10] に示す種培養培地 120 L を含む 200 L 発酵槽で 24℃、通気 120 L/min、タンク内圧 1 kg/cm²、攪拌 150 rpm 下で 48 時間培養し、その 100 ml を、[表 12] に示す
20 主培養培地 3 リットルを含む 5 L ジャーファーマンターに移植し 24℃ で培養し 66 時間目から 28℃ で培養を行った。

この培養液に終濃度が 0.05% になる様にアンスラニル酸 (NaOH で pH 7.0 に調製) を 0 時間目から 90 時間目までに徐々に添加し、培養を 234 時間まで行ったところ培養液に 1661 μg/ml のインドールマイシンが蓄積していた。一方滅菌水のみを添加したものは 1323 μg/ml のインドールマイシンが蓄積していた。

実施例 8

ストレプトミセス グリセウス 6FW-1-8-5 の凍結保存菌 1 ml を [表 9] に示す前培養培地 500 ml を含む 2.0 L 容坂口フラスコに接種し 28℃、

48時間振とう培養した。その500mLを〔表10〕に示す種培養培地120Lを含む200L発酵槽で24℃、通気120L/min、タンク内圧1kg/cm²、攪拌150rpm下で48時間培養し、その100mlを、〔表12〕に示す主培養培地3リットルを含む5Lジャーフェーマンターに移植し24℃で培養し66時間目から28℃で培養を行った。

L-トリプトファンと アンスラニル酸 (NaOHでpH7.0に調製) の終濃度がそれぞれ0.1%になる様に0時間目から90時間まで徐々に添加し、培養を234時間まで行ったところ培養液に1831μg/mlのインドールマイシンが蓄積していた。一方滅菌水のみを添加したものは1323μg/mlのインドールマイシンが蓄積していた。

上述の実施例中で用いられた培地組成を以下の表に示す。

〔表1〕

培地成分	濃度 (%)
グルコース	1.0
L-アスパラギン	0.05
K ₂ HPO ₄	0.05
MgSO ₄ ・7H ₂ O	0.02
FeSO ₄ ・7H ₂ O	0.001
(pH 7.0)	
寒天	2.0

〔表2〕

培地成分	濃度 (%)
マルトース	0.8
酵母エキス	0.08
肉エキス	0.08
バクトトリプトン	0.1
(pH 7.0)	
寒天	2.0

〔表3〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	2.0
ソルブルスターチ	3.0
生大豆粉	1.0
コーンスチープリカー	0.3
酵母エキス	0.3
ポリペプトン	0.1
NaCl	0.3
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.5

〔表4〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	4.0
脱脂大豆粉	3.0
コーンスチープリカー	0.6
酵母エキス	0.2
NaCl	0.06
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.1

〔表 5〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	0.5
ソルブルスターチ	3.0
生大豆粉	1.0
コーンスチープリカー	0.3
酵母エキス	0.5
ポリペプトン	0.1
NaCl	0.3
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.5

〔表 6〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	6.0
脱脂大豆粉	3.0
コーンスチープリカー	0.6
酵母エキス	0.2
NaCl	0.06
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
β-シクロデキストリン	1.0
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.1

〔表 7〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	2.0
ソルブルスターチ	3.0
脱脂大豆粉	2.0
コーンスチープリカー	0.3
酵母エキス	0.5
ポリペプトン	0.1
NaCl	0.3
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.5

〔表 8〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	10.0
脱脂大豆粉	4.0
コーンスチープリカー	1.0
酵母エキス	0.2
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.3
アクトコール	0.01

5 〔表 9〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	2.0
ソルブルスターチ	3.0
脱脂大豆粉	2.0
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.5

〔表10〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	2.0
ソルブルスターチ	3.0
脱脂大豆粉	2.0
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.5
アクトコール	0.05
シリコンオイル	0.05

〔表11〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	7.0
脱脂大豆粉	4.0
コーンスチープリカー	1.0
酵母エキス	0.2
NaCl	0.06
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.05
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.02
(pH 7.0)	
CaCO ₃	0.3
アクトコール	0.05
シリコンオイル	0.05

〔表 1 2〕

培地成分	濃度 (%)
精製ブドウ糖	10.0
脱脂大豆粉	5.0
コーンスチープリカー	0.3
酵母エキス	0.5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
アクトコール	0.05
シリコン	0.05
(pH 7.0)	
CaCO_3	0.3

産業上の利用可能性

- 5 本発明によれば、効率的にインドールマイシンを製造することができる。すなわち、トリプトファンアナログに耐性を有する変異株を用い培地で培養することにより大量にインドールマイシンを得ることができる。更に、培地にトリプトファンを加え培養することにより培養液当りのインドールマイシンの蓄積量は大幅に向上する。従って、インドールマイシンを工業的に大量に生産することができる。
- 10

請 求 の 範 囲

1. インドールマイシン生産能を有し、トリプトファンアナログ耐性を有する微生物。
- 5 2. 微生物がストレプトミセス属に属する微生物である請求項1記載の微生物。
3. 微生物がストレプトミセス・グリセウスに属する微生物である請求項1記載の微生物。
4. トリプトファンアナログがフルオロ-DL-トリプトファンである請求項1記載の微生物。
- 10 5. 請求項1記載の微生物を培地で培養し、培養液中にインドールマイシンまたはその塩を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするインドールマイシンまたはその塩の製造法。
6. 培地にL-トリプトファンおよび/またはアンスラニル酸を添加することを特徴とする請求項5記載の製造法。
- 15 7. L-トリプトファンを培地1Lあたり0.2~5g添加することを特徴とする請求項5記載の製造法。
8. アンスラニル酸を培地1Lあたり0.2~10g添加することを特徴とする請求項5記載の製造法。
9. 培地1LあたりL-トリプトファン0.2~3gおよびアンスラニル酸0.2~2gを添加することを特徴とする請求項5記載の製造法。
- 20 10. 吸着樹脂、塩基性陰イオン交換性樹脂または/および酸性陽イオン交換樹脂を担体とし、含水有機溶媒を用いて溶出精製することを特徴とする請求項5記載の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/04073

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12N1/20, C12P17/18, C07D413/06, A01N43/76, 63/02, A61K31/42

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. Cl⁵ C12N1/20, C12P17/18, C07D413/06, A01N43/76, 63/02, A61K31/42

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)

CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WERNER, R. et al., "Directed biosynthesis of new indolmycins." Vol. 34(5), p.551-554 (1981), Full text	1-10
A	JP, 62-99306, A (Bayer AG), 08 May, 1987 (08.05.87), See claims and examples & DE, 3537825, A1 & EP, 223055, A1	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
16 November, 1999 (16.11.99)

Date of mailing of the international search report
24 November, 1999 (24.11.99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁶ C12N1/20, C12P17/18, C07D413/06, A01N43/76, 63/02, A61K31/42		
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. Cl ⁶ C12N1/20, C12P17/18, C07D413/06, A01N43/76, 63/02, A61K31/42		
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		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CA (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (DIALOG), WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
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
A	WERNER, R. et al., "Directed biosynthesis of new indolmycins.", J. Antibiot., Vol. 34(5), p. 551-554(1981), 文献全体参照	1-10
A	JP, 62-99306, A (パ イエル・アグチェン ゲゼルシャフト), 8.5月1987(08.05.87), 特許請求の範囲及び実施例参照, & DE, 3537825, A1 & EP, 223055, A1	1-10
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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」 国際出願日前の出願または特許であるが、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		
国際調査を完了した日 16. 11. 99	国際調査報告の発送日 24.11.99	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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) 坂崎 恵美子 印	4 N 9 4 5 1
電話番号 03-3581-1101 内線 3488		