(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年8 月8 日 (08.08.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/061077 A1

(51) 国際特許分類[7]: C12N 15/09, 9/80, 5/10, C12P 13/04

(21) 国際出願番号: PCT/JP02/00853

(22) 国際出願日: 2002 年2 月1 日 (01.02.2002)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2001-24986 2001 年2 月1 日 (01.02.2001) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 三井化学株式会社 (MITSUI CHEMICALS, INC.) [JP/JP]; 〒100-6070 東京都 千代田区 霞が関三丁目２番５号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 長部 雅己 (OSABE,Masami) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原市 東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 高橋 克幸 (TAKAHASHI,Katsuyuki) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原市 東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 八巻 俊文 (YAMAKI,Toshifumi) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原市 東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 有井 輝夫 (ARII,Teruo) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原市 東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP). 及川 利洋 (OIKAWA,Toshihiro) [JP/JP]; 〒297-0017 千葉県 茂原市 東郷1144 三井化学株式会社内 Chiba (JP).

(74) 代理人: 金田 暢之, 外(KANEDA,Nobuyuki et al.); 〒107-0052 東京都 港区 赤坂１丁目９番２０号 第１６興和ビル８階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) **Title:** DNA ENCODING NOVEL D-AMINOACYLASE AND PROCESS FOR PRODUCING D-AMINO ACID BY USING THE SAME

(54) 発明の名称: 新規なD–アミノアシラーゼをコードするDNAおよびそれを用いたD-アミノ酸の製造方法

(57) **Abstract:** A novel D-aminoacylase which is obtained by cloning a DNA encoding the novel D-aminoacylase from *Methylobacteruim mesophilicum* MT10894, etc. and which shows a sufficiently high activity at an industrially available substrate concentration to thereby enable efficient production of a D-amino acid from an N-acyl-DL-amino acid; a DNA encoding this D-aminoacylase; a process for producing a D-amino acid from the corresponding N-acylamino acid by using a transformant containing this DNA; etc.

(57) 要約:

Methylobacterium mesophilicum ＭＴ１０８９４などから新規Ｄ－アミノアシラーゼをコードするＤＮＡをクローニングして、産業上実用的な基質濃度で充分な高活性を示し、Ｎ－アシル－ＤＬ－アミノ酸よりＤ－アミノ酸を効率よく生成する事が出来る新規なＤ－アミノアシラーゼ及びそれをコードするＤＮＡ、並びに該ＤＮＡを含む形質転換体を用いたＮ－アシルアミノ酸から対応するＤ－アミノ酸を製造する方法などを提供する。

WO 02/061077 A1

明 細 書

新規なＤ－アミノアシラーゼをコードするＤＮＡおよびそれを用いたＤ－アミノ酸の製造方法

技 術 分 野

本発明は、産業上実用的な基質濃度で高活性を示し、特にＮ－アセチル－ＤＬ－トリプトファンよりＤ－トリプトファンを立体選択的に効率よく生成する事を可能とするな新規なＤ－アミノアシラーゼ及びそれを用いたＮ－アシルアミノ酸からＤ－アミノ酸を製造する方法に関する。さらに本発明は、このＤ－アミノアシラーゼをコードする塩基配列、それを含有するプラスミド及びこのプラスミドにより形質転換された形質転換体に関する。さらに本発明は、この形質転換体を用いたＤ－アミノアシラーゼの生産方法に関する。また、本発明は、この形質転換体、その培養液及びこれらの処理物の形でＤ－アミノアシラーゼをＮ－アシルアミノ酸に作用させてＮ－アシルアミノ酸から対応する光学活性Ｄ－アミノ酸を製造する方法に関する。

背 景 技 術

Ｄ－アミノ酸は様々な農薬、抗生物質、医薬品の中間体として重要な化合物であり、その合成法が盛んに研究されている。現在、ＤＬ－アミノ酸の分割は物理化学的、化学的、酵素的方法で行なう事が出来るが、酵素的方法が最も簡便であり、有利な方法と考えられる。酵素的方法の一つとして例えば、Ｄ－アミノアシラーゼを用いてＮ－アセチル－ＤＬ－アミノ酸を加水分解し、対応するＤ－アミノ酸を直接生産する方法が知られている。

Ｄ－アミノアシラーゼの起源としては、シュウドモナス（Pseudomonas）属（特公昭６０－３１４７７号公報）、ストレプトミセス（Streptomyses）属（特公昭５３－３６０３５号公報）、アルカリゲネス（Alcaligenes）属（特公平０７－８３７１１号公報）ロドコッカス属(Rhodococcus)、ピメロバクター(Pimelobacter)属（特開

平０６－２２７７８９号公報）アースロバクター(Arthrobacter)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、エルビニア(Erwinia)属、エシュリヒア(Eschheria)属、フラボバクテリウム(Flavobacterium)属、ノカルディア(Nocardia)属、プロタミノバクター（Protaminobacter）属、キサントモナス(Xanthomonas)属（特開平１１－１１３５９２号公報）、アミコラトプシス(Amycolatopsis)属（特開平１１－９８９８２号公報）、セベキア(Sebekia)属（特開平１１－３１８４４２号公報）、ヒポミセス(Hypomyces)属、フザリウム(Fusarium)属、オーリクラリア(auricularia)属、フィシウム(Pythium)属、メニスポロプシス(Menisporopsis)属（特開平１２－４１６８４号公報）などの細菌、放線菌またはかびに属する微生物が知られており、これらに由来するＤ－アミノアシラーゼをＮ－アシルアミノ酸に作用させてＤ－アミノ酸を製造することが報告されている。

しかしながら、これらＤ－アミノアシラーゼは実用的な基質濃度での活性が充分ではなく、産業上実用的なＤ－アミノアシラーゼが望まれていた。特にＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの加水分解については、実用的な基質濃度での酵素の活性は低く、産業上満足のできる酵素とは呼べなかった。近年、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンに作用してＤ－トリプトファンを生成することの出来るＤ－アミノアシラーゼとしてＴｏｋｕｙａｍａらがヒポミセス(Hypomyces)属のＤ－アミノアシラーゼ（特開平１３－２７５６８８号公報）をＣｈｉｒｏｔｅｃｈ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｌｉｍｉｔｅｄ社のＴａｙｌｏｒらがアルカリゲネス（Alcaligenes）属のＤ－アミノアシラーゼ（ＷＯ００／２３５９８）を報告しているが、どちらのＤ－アミノアシラーゼも１０ｇ／ｌ程度までのＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンを加水分解するに過ぎず、実用的な基質濃度での反応を触媒できる酵素とは言い難い。

Ｄ－アミノ酸は医薬品原料などとして重要な化合物であり、安価な製法開発が望まれている。しかしながら、Ｄ－アミノ酸を効率よく触媒する事が出来るＤ－アミノアシラーゼはこれまで一切知られていなかった。

発　明　の　開　示

本発明の目的は、産業上実用的な基質濃度で充分な高活性を示し、Ｎ－アシル－

ＤＬ－アミノ酸よりＤ－アミノ酸を効率よく生成する事が出来る新規なＤ－アミノアシラーゼ及びそれを用いたＮ－アシルアミノ酸からの対応するＤ－アミノ酸の製造方法を提供することにある。本発明の他の目的は、このＤ－アミノアシラーゼの生産及びＤ－アミノアシラーゼを用いたＤ－アミノ酸の製造に有用な材料としてのＤ－アミノアシラーゼをコードする塩基配列、この塩基配列を組み込んだプラスミド及びこのプラスミドで形質で宿主を形質転換して得られた形質転換体を提供することにある。

本発明者らは上記課題を解決すべく、種々の微生物由来のＤ－アミノアシラーゼについて、それらの性質を評価した。基質濃度と反応速度の相関性を調べたところ、驚くべき事に公知のＤ－アミノアシラーゼにおいては、基質濃度が高いほど反応速度は著しく低下するといった現象、すなわち基質による酵素活性の阻害現象を見出す事が出来た。この現象は特に基質がＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの場合が著しく、それゆえに従来のＤ－アミノアシラーゼにおいては実用的な基質濃度でＮ－アセチル－ＤＬ－トリプトファンよりＤ－トリプトファンを効率的に生成する事が困難となっているのではないかと考察するに至った。

そこで、本発明者らは様々な微生物について、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンに対して阻害のかかりにくく、基質濃度が高い場合も高活性を示す新規なＤ－アミノアシラーゼの探索した結果、メチロバクテリウム（Methylobacterium）属に属する微生物及びノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物において、目的に適う新規なＤ－アミノアシラーゼ活性を有する微生物を発見した。そして、メチロバクテリウム（Methylobacterium）属に属する微生物由来のＤ－アミノアシラーゼを種々の精製方法を組合せて、配列番号：３に示されるＮ末端アミノ酸残基の配列の決定に成功した。さらに本発明者等は配列表の配列番号：１に示される塩基配列を有するＤＮＡを獲得することにより、この塩基配列を有するＤＮＡ断片を含んだプラスミドによる形質転換体を取得し、上記のＤ－アミノアシラーゼを活性型として産生させること、さらには実用的な基質濃度においてＮ－アシルアミノ酸から対応するＤ－アミノ酸を高効率的で製造することに成功し、本発明を完成するに至った。

上記の本発明者らによる新たな知見に基づいて成された本発明は以下の各態様を含むものである。

（１）　Ｎ－アシル－Ｄ－アミノ酸に作用して対応するＤ－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有するＤ－アミノアシラーゼであって、

水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際におけるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％である事を特徴とするＤ－アミノアシラーゼ。

（２）　Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である上記項目（１）に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

（３）　メチロバクテリウム（Methylobacterium）属又はノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物由来である上記項目（１）に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

（４）　メチロバクテリウム（Methylobacterium）属に属する微生物がメチロバクテリウム・メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）種、ノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種である上記項目（３）に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

（５）　ノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）ＡＴＣＣ３５８６３株である上記項目（４）に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

（６）Ｎ－アシル－Ｄ－アミノ酸に作用して対応するＤ－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有するＤ－アミノアシラーゼであって、

（Ａ）配列表の配列番号：２記載のアミノ酸配列または

（Ｂ）該アミノ酸配列に対して前記触媒活性を維持し得る範囲内で１以上のアミノ酸残基の挿入、欠失または置換を行って得られる変異アミノ酸配列

を有することを特徴とするＤ－アミノアシラーゼ。

（７）　水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際におけるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／ｌの場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合の反応速度に対して少なくとも４０％である上記項目（６）に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

（８）　Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／ｌの場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合の反応速度に対して少なくとも２０％である上記項目（７）に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

（９）　Ｎ－アシル－Ｄ－アミノ酸に作用して対応するＤ－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有するＤ－アミノアシラーゼをコードする塩基配列であって、

（ａ）配列表の配列番号：１記載の塩基配列または

（ｂ）配列番号：１の塩基配列に対して該塩基配列がコードするＤ－アミノアシラーゼの作用が維持される範囲内で１以上の塩基の挿入、欠失または置換を行って得られる変異塩基配列

からなることを特徴とするＤ－アミノアシラーゼをコードする塩基配列。

（１０）　前記変異塩基配列が、前記配列番号：１の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものである上記項目（９）に記載の塩基配列。

（１１）　Ｄ－アミノアシラーゼの水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際のＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／ｌの場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合の反応速度に対して少なくとも４０％である上記項目（９）に記載の塩基配列。

（１２）　Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／ｌの場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合の反応速度に対して少なくとも２０％である上記項目（１１）に記載の塩基配列。

（１３）　上記項目（９）に記載の塩基配列を含むプラスミド。

（１４）　上記項目（１３）に記載のプラスミドによって形質転換された形質転換体。

（１５） 上記項目（１４）に記載の形質転換体を培養して、該形質転換体に組み込まれたプラスミドの有する塩基配列によりコードされたＤ－アミノアシラーゼを生産させることを特徴とするＤ－アミノアシラーゼの産生方法。

（１６） 水性媒体中でＮ－アシルアミノ酸にＤ－アミノアシラーゼを作用させて対応するＤ－アミノ酸を生産する光学活性アミノ酸の生産方法であって、該Ｄ－アミノアシラーゼが水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際におけるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％であることを特徴とする光学活性アミノ酸の生産方法。

（１７） Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である上記項目１６記載の生産方法。

（１８） メチロバクテリウム（Methylobacterium）属又はノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物由来である上記項目１６に記載の生産方法。

（１９） メチロバクテリウム（Methylobacterium）属に属する微生物がメチロバクテリウム・メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）種、ノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種である上記項目１８記載の生産方法。

（２０） ノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）ＡＴＣＣ３５８６３株である上記項目１９記載の生産方法。

（２１） Ｎ－アシルアミノ酸濃度が５０ｇ／１以上である上記項目１６に記載の製造方法。

（２２） Ｎ－アシルアミノ酸濃度が１００ｇ／１以上である上記項目２１記載の製造方法。

（２３） 水性媒体中でＮ－アシルアミノ酸にＤ－アミノアシラーゼを作用させて対応するＤ－アミノ酸を生産する光学活性アミノ酸の生産方法であって、該Ｄ－アミノアシラーゼが請求項６に記載のＤ－アミノアシラーゼであることを特徴とする

光学活性アミノ酸の生産方法。

（２４） 前記Ｄ－アミノアシラーゼが水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際のＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／ｌの場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合の反応速度に対して少なくとも４０％である上記項目２３に記載の生産方法。

（２５） Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／ｌの場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合の反応速度に対して少なくとも２０％である上記項目２４に記載の生産方法。

（２６） Ｄ－アミノアシラーゼを、請求項１４に記載の形質転換体を培養して得られる培養液、該培養液から分離された形質転換体又はそれらの処理物の形でＮ－アシルアミノ酸に作用させる上記項目２３に記載の生産方法。

（２７） Ｎ－アシルアミノ酸濃度が５０ｇ／ｌ以上である上記項目２３に記載の製造方法。

（２８） Ｎ－アシルアミノ酸濃度が１００ｇ／ｌ以上である上記項目２７記載の製造方法。

本発明にかかるＤ－アシルアミラーゼを用いることで産業上実用的な基質濃度を用いて改善された反応速度でのＮ－アシルアミノ酸からの対応するＤ－アミノ酸の製造が可能となる。更に、本発明によれば、この有用なＤ－アシルアミラーゼの遺伝子組み換え技術を用いた生産に有用な塩基配列、それを組み込んだプラスミド及びこのプラスミドで宿主を形質転換した形質転換体を提供することができる。

図面の簡単な説明

図１は組替えプラスミドｐＵＳＤＡ３の物理的地図を示す図である。図中、oriはプラスミドの複製開始点を、Amp^rはアンピシリン耐性マーカーを、SacI, HincII, PstI, XhoIは各々制限酵素認識部位をそれぞれ示す。また、太矢印はＤ－アミノアシラーゼのＯＲＦの位置と向きを示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明にかかるD－アミノアシラーゼは、N－アシル－D－アミノ酸に作用して対応するD－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有する酵素であり、特にN－アセチル－D－トリプトファンに対して阻害がかかりにくく、基質濃度が高い場合も高活性を示すことに特徴を有するものである。このN－アセチル－D－トリプトファンによる阻害作用は、以下に記載する基質濃度と反応速度との関係により規定することができる。

Ⅰ．水性媒体中においてN－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％である。

II．N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である。

本発明にかかるD－アミノアシラーゼは上記の阻害に関する特性Ⅰを有するものであり、上記阻害に関する特性Ⅰ及びII の両方を有するものが好ましい。従って、少なくとも上記阻害に関する特性ⅠのD－アミノアシラーゼ活性を有する酵素であれば、いかなる微生物由来であっても、もしくは公知のD－アミノアシラーゼを遺伝子組換により改変したものであっても、本発明に包含されるものとする。

更に、上記特性Ⅰに関しては、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも５０％、特に少なくとも６０％である事が更に好ましい。また、上記特性II に関しては、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２５％、特に少なくとも３０％である事が更に好ましい。

また本発明における基質濃度と反応速度の関係は次の様にして確認する事ができる。例えば、１０ｇ／１、５０ｇ／１、１００ｇ／１、２００ｇ／１の基質（N－アセチル－D－トリプトファン）をそれぞれ含む１００mMのリン酸緩衝液２００μ１に反応に十分な活性量の酵素液を２００μ１添加し３０℃において適当な時間

反応させる。この反応によって生成するＤ－トリプトファンの量をＨＰＬＣ法などで測定する事により、各基質濃度における酵素活性（反応速度）を比較する事ができる。本発明において反応速度を測定する際の水性媒体は、酵素反応を進行させることができるものであれば特に限定されず、水はもちろんの事、リン酸、トリス、クエン酸、酢酸、ホウ酸、グリシン、ＨＥＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＥＳ、ＣＡＰＳ、ＣＨＥＳ、ＰＩＰＥＳなどから適宜一種または二種以上選択して成る成分を水に含有させた緩衝液を用いることができる。反応温度はＤ－アミノアシラーゼが活性を発現できる、至適温度を含む温度範囲から選択することができ、例えば３０℃～６０℃に維持する事が特に望ましい。また反応ｐＨも、Ｄ－アミノアシラーゼが活性を維持できる範囲であればよく、特に至適ｐＨを含むｐＨ６～１１に維持する事が望ましい。また酵素は菌体の培養液そのものや該培養液より遠心分離などによって分離、回収して得られる菌体、また該菌体の抽出物、磨砕物、分離精製物を使用できる。また本発明において反応速度を測定する際の酵素の使用量や反応時間は有意に反応速度が測定できる条件、例えば反応速度の測定時間内で反応が飽和状態に達しない条件であればよく、基質となるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／ｌの場合にＤ－トリプトファンの生成蓄積濃度が０．２ｇ／ｌ～１ｇ／ｌ程度の条件である事が望ましい。

本発明にかかるＤ－アミノアシラーゼの物性は以下のとおりである。

至適ｐＨ：ｐＨ８～１０（最適はｐＨ９）

至適温度：６０℃

熱安定性：４０℃／２０時間の熱処理で８０％の残存活性を示す。

本発明におけるＤ－アミノアシラーゼの一態様は、配列表の配列番号：２に記載のアミノ酸配列、あるいは配列番号：２に記載のアミノ酸配列に１もしくは２以上、好ましくは数個のアミノ酸がＤ－アミノアシラーゼ活性が維持し得る範囲内で置換、欠失、修飾または挿入または付加されたアミノ酸配列を有する。

本発明におけるＤ－アミノアシラーゼをコードするポリヌクレオチドは配列表の配列番号：１に記載の塩基配列を含む。配列番号：１に示す塩基配列は、配列番号：２に示すタンパク質をコードする。ただし、配列番号：２に示すアミノ酸配列をコードする塩基配列には、配列番号：１に示す塩基配列のみならず、異なるコドンに

基づくあらゆる塩基配列が含まれる。更に適宜置換、欠失、修飾または挿入または付加を導入する事によりポリヌクレオチドのホモログを得る事も可能である。本発明におけるポリヌクレオチドのホモログは配列番号：１に示す塩基配列に対して、これによりコードされるＤ－アシルアミラーゼが所定の酵素活性を維持し得る範囲内で塩基の置換、欠失または付加を行って得られるものである。このホモログには、例えば、配列番号：１の塩基配列の相補配列を有するポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズできる塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

このストリンジェントな条件でのハイブリダイゼーションは、例えばＭｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ；Ｗｉｌｅｙ Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅに記載の方法によって行なう事ができ、市販のシステムとしては、ＧｅｎｅＩｍａｇｅシステム（アマシャム）を挙げる事ができる。具体的には以下の操作によってハイブリダイゼーションを行なう事ができる。試験すべきＤＮＡまたはＲＮＡ分子を転写した膜を製品プロトコールに従って、標識したプローブとプロトコール指定のハイブリダイゼーションバッファー中でハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションバッファーの組成は、０．１重量％ＳＤＳ、５重量％デキストラン硫酸、１／２０溶のキット添付のブロッキング試薬及び２～７×ＳＳＣからなる。ブロッキング試薬としては例えば、１００×Ｄｅｎｈａｒｄｔ‘ｓ ｓｏｌｕｔｉｏｎ、２％（重量／容量）Ｂｏｖｉｎｅ ｓｅｒｕｍ ａｌｂｕｍｉｎ、２％（重量／容量）Ｆｉｃｌｌ™４００、２％（重量／容量）ポリビニルピロリドンを５倍濃度で調整したものを１／２０に希釈して使用する事ができる。２０×ＳＳＣは、３Ｍ塩化ナトリウム、０．３Ｍクエン酸溶液であり、ＳＳＣは、より好ましくは３～６×ＳＳＣ、更に好ましくは４～５×ＳＳＣの濃度で使用する。ハイブリダイゼーションの温度は４０～８０℃、より好ましくは５０～７０℃、更に好ましくは５５～６５℃の範囲であり、数時間から一晩のインキュベーションを行なった後、洗浄バッファーで洗浄する。洗浄の温度は、好ましくは室温、より好ましくはハイブリダイゼーション時の温度である。洗浄バッファーの組成は６×ＳＳＣ＋０．１重量％ＳＤＳ溶液、より好ましくは４

×ＳＳＣ＋０．１重量％ＳＤＳ溶液、更に好ましくは１×ＳＳＣ＋０．１重量％ＳＤＳ溶液、最も好ましくは０．１×ＳＳＣ＋０．１重量％ＳＤＳ溶液である。このような洗浄バッファーで膜を洗浄し、プローブがハイブリダイズしたＤＮＡ分子またはＲＮＡ分子をプローブに用いた標識を利用して識別する事ができる。

本発明による新規なＤ－アミノアシラーゼには、Methylobacterium mesophilicum ＭＴ１０８９４株由来のもの及び Nocardioides thermolilacinus ＡＴＣＣ３５８６３株由来のものが含まれる。Methylobacterium mesophilicum ＭＴ１０８９４株は千葉県茂原市の土壌から分離した。その菌学的性質を示すと表１の通りである。

表１

培養温度		３０℃
細胞形態		桿菌（０．８×１．５μm）
グラム染色		—
胞子		—
運動性		＋
コロニー形態		円形 全縁なめらか 凸状 光沢 淡黄色
カタラーゼ		＋
オキシダーゼ		＋
Ｏ/Ｆ試験		発酵的に分解されない。
硝酸塩還元		—
インドール産生		—
ブドウ糖酸性化		—
アルギニンジヒドロラーゼ		—
ウレアーゼ		＋
エスクリン加水分解		—
ゼラチン加水分解		—
β—ガラクトシダーゼ		—
ＭａｃＣｏｎｋｅｙ寒天での生育		—
４２℃での生育		—
基質資化能	ブドウ糖	＋
	Ｌ－アラビノース	＋
	Ｄ－マンノース	—
	Ｄ－マンニトール	—
	Ｎ－アセチル－Ｄ－グルコサミン	—
	マルトース	—
	グルコン酸カリウム	＋
	ｎ－カプリンサン	—
	アジピン酸	—
	ｄｌ－リンゴ酸	＋
	クエン酸ナトリウム	—
	酢酸フェニル	—

以上の菌学的緒性質を「バージェイーズ・マニュアル・オブ・システマチック・バクテリオロジー第１巻（１９８４）ウイリアムス＆ウイルキンス[Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.1(1984) Williams&Wilkins]」、「バージェイーズ・マニュアル・オブ・デターミティブ・バクテリオロジー第９版（１９９４）ウイリアムス＆ウイルキンス[Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition(1994) Williams&Wilkins]」、「ジー アイ バロー &アール ケイ エイ フェルタム版：コーエン アンド スチールス マニュアル フォー ザ アイデンティフィケーション オブ メディカル バクテリア 第３版 ケンブリッジ ユニバーシティ プレス （１９９３） [G.I Barrow and R.K.A.Feltham ed.,Cowan&Steel's Mannual for the Identification of Medical Bacteria 3rd.ed,Cambridge univ.press,(1993)]」の分類に当てはめて本株の同定を行った結果、本菌株はMethylobacterium mesophilicumに属すると考えられた。この菌株ＭＴ１０８９４は受託番号ＦＥＲＭ Ｐ－１７７７１として茨城県つくば市東１丁目１番１号経済産業省産業技術総合研究所生命工学工業研究所に２０００年３月８日付けで寄託され、平成１４年１月２１日付けのブタペスト条約に基づく国際寄託への移管により寄託番号はＦＥＲＭ ＢＰ－７８５６に変更された。

本発明の新規なＤ－アミノアシラーゼをコードするＤＮＡは、例えば、以下の様な方法によって単離することができる。微生物からゲノムＤＮＡを精製し、制限酵素によって消化した後に得られたＤＮＡを超遠心分離もしくは電気泳動等によって、その長さによって分画する。その分画試料のＤＮＡを回収してプラスミドに組み込むことによってプラスミドライブラリーを作成し、その中からＤ－アミノアシラーゼ活性を持つクローンを選抜してＤ－アミノアシラーゼ遺伝子をコードするＤＮＡを含むプラスミドを取得する。そのプラスミドの塩基配列を解析することによって、目的のＤ－アミノアシラーゼ遺伝子をコードするＤＮＡの塩基配列が判明し、ＤＮＡの塩基配列からコードされているＤ－アミノアシラーゼのアミノ酸配列を推定することが出来る。

上記のようにして単離された本発明のＤ－アミノアシラーゼをコードするＤＮＡを、例えば宿主が大腸菌の場合、ｐＵＣ１８やｐＫＫ２２３－３、ｐＢＲ３２２、ＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔＩＩ ＳＫ（＋）、ｐＳＣ１０１などに代表される発現用のプ

ラスミドに組み込むことにより、Ｄ－アミノアシラーゼ発現プラスミドが提供される。尚、形質転換に使用する宿主生物としては、組換えベクターが安定、かつ自律的に増殖可能で、さらに外来性ＤＮＡの形質が発現できるものであればよく、例として大腸菌が挙げられるが、特に大腸菌に限定されるものではない。

そして、本発明においては該プラスミドで形質転換して得られた形質転換体を公知の情報に基づいて、培養することができ、本発明のＤ－アミノアシラーゼを産生させることができる。培地としては炭素源、窒素源、無機物及びその他の栄養素を適量含有する培地ならば合成培地または天然培地のいずれでも使用可能である。培養は前記培養成分を含有する液体培地中で振とう培養、通気攪拌培養、連続培養、流加培養などの通常の培養方法を用いて行なう事が出来る。培養条件は、培養の種類、培養方法により適宜選択すればよく、菌株が生育しＤ－アミノアシラーゼを産生できる条件であれば特に制限はない。

また、本発明におけるＤ－アミノ酸の製造方法においては、Ｄ－アミノアシラーゼを、上記のＤ－アミノアシラーゼ生産菌の培養液そのものや、該培養液より遠心分離によって分離・回収して得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物の形で利用することもできる。ここでいう菌体処理物とは、該形質転換菌体の抽出物や磨砕物、該抽出物や磨砕物のＤ－アミノアシラーゼ活性画分を分離・精製して得られる分離物、該形質転換菌体や該形質転換菌体の抽出物、磨砕物、分離物を適当な担体を用いて固定化した固定化物の事を示している。また宿主微生物由来の活性成分が該培養液そのものや、該培養液より遠心分離によって分離・回収して得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物の本来の目的とする反応の反応性や選択性に悪影響を及ぼす場合が考えられる。この場合、該培養液そのものや、該培養液より遠心分離によって分離・回収して得られる形質転換菌体、該形質転換菌体の菌体処理物を反応に先立ってか、もしくは反応と同時に、有機溶媒処理または熱処理を施す事によって反応性や選択性を改善する事が可能である。有機溶媒としてはメタノール、エタノールなどのアルコール類やアセトン、ＴＨＦ、ＤＭＦ、ＤＭＩ、ＤＭＳＯなどの水溶性の有機溶媒やトルエンやベンゼンなどの芳香族系有機溶媒、酢酸エチルや酢酸ブチルなどのエステル類、ヘキサンやヘプタンなどの炭化水素類、ジクロロメタンやクロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、ジエチルエ

ーテルなどのエーテル類などから、適宜一種または二種以上選択して使用する事ができる。有機溶媒の使用量はＤ－アミノアシラーゼ活性の安定な範囲で使用すれば良い。また熱処理を行なう場合、４０℃～７０℃程度で行なう事ができる。Ｄ－アミノアシラーゼの安定性を考慮すれば４５℃～５５℃で行なう事が望ましい。熱処理時間はＤ－アミノアシラーゼ活性の安定な範囲であればよく、３０分～１００分も行なえば充分である。

本発明のＤ－アミノアシラーゼをＮ－アシル－Ｄ－アミノ酸に作用させる際には、Ｄ－アミノアシラーゼの活性や安定性など反応性にとって好ましい条件を選択することが望ましい。

反応に用いる媒体としては、水あるいは各種緩衝液からなる水性媒体を用いることができる。緩衝液としては、リン酸、トリス、クエン酸、酢酸、ホウ酸、グリシン、ＨＥＰＥＳ、ＭＯＰＳ、ＭＥＳ、ＣＡＰＳ、ＣＨＥＳ、ＰＩＰＥＳなどから適宜一種または二種以上選択して成る成分を水に含有させた緩衝液を挙げることができる。

また、反応効率や生産物の収率を更に向上させるために各種の添加剤を必要に応じて用いることができる。Ｄ－アミノアシラーゼには金属イオン、例えばZn^{2+}やCo^{2+}などで活性化されるものもあるため、これら２価金属を反応液に添加する事もできる。また逆に金属イオンにより阻害を受ける場合にはＥＤＴＡなどのキレート剤を添加する事もできる。

本発明におけるＤ－アミノ酸の製造に用いる原料（Ｎ－アシルアミノ酸）としては、Ｎ－アシル－Ｄ－アミノ酸を含むものであって、ＤＬ体、Ｄ体の割合の多い光学活性体、Ｄ体のみからなるものなどを用いることができる。

出発原料の濃度は特に制限はないが通常１ｇ／ｌ～３００ｇ／ｌ程度の濃度で用いられる。とりわけ反応性や経済性を鑑みれば、好ましくは５０ｇ／ｌ以上、より好ましくは１００ｇ／ｌ以上で、好ましくは２００ｇ／ｌ以下の濃度が好適である。反応温度はＤ－アミノアシラーゼがその活性を発現できる温度に維持する事が好ましく、特に３０～６０℃に維持する事が望ましい。また反応ｐＨも、Ｄ－アミノアシラーゼがその活性を発現できるｐＨに維持する事が好ましく、特にｐＨ６～１１に維持する事が望ましい。

本発明の新規なＤ－アミノアシラーゼは種々のＮ－アシルアミノ酸のＤ体から対応するＤ－アミノ酸を生じる性質を有しており、本発明のＤ－アミノアシラーゼを用いてＮ－アシル－ＤＬ－アミノ酸より光学活性アミノ酸を工業的に有利に製造する事が可能である。適応可能なＮ－アシル－ＤＬ－アミノ酸としては特に制限されず、広い範囲の化合物から選択できる。代表的な好ましいＮ－アシル－ＤＬ－アミノ酸としては、Ｎ－アシル－ＤＬ－メチオニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ロイシン、Ｎ－アシル－ＤＬ－トリプトファン、Ｎ－アシル－ＤＬ－５－ヒドロキシトリプトファン、Ｎ－アシル－ＤＬ－フェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－フェニルグリシン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ホモフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ビスホモフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ｐ－ニトロフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ｐ－フルオロフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ｐ－クロロフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ｐ－ブロモフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－ｐ－メトキシフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－チロシン、、Ｎ－アシル－ＤＬ－ｐ－シアノフェニルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－２－ピリジルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－３－ピリジルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－４－ピリジルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－o—ベンジルセリン、Ｎ－アシル－ＤＬ－Ｓ－フェニルシステイン、Ｎ－アシル－ＤＬ－１－ナフチルアラニン、Ｎ－アシル－ＤＬ－２－ナフチルアラニンなどを挙げることが出来る。更に好ましいＮ－アシル－ＤＬ－アミノ酸としてはＮ－アセチル－ＤＬ－アミノ酸が挙げられ、とりわけＮ－アセチル－Ｄ－フェニルアラニン、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンに対して高い基質特異性を示す。

【実施例】

以下、本発明を実施例によりさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

尚、反応性及び光学純度は、反応で生成するＤ－アミノ酸及び残存するＮ－アシルアミノ酸を高速液体クロマトグラフィ法（カラム：ＣＲＯＷＮＰＡＫ ＣＲ（－）（ダイセル化学工業製）、カラム温度４０℃、移動相：$HClO_4$水溶液ｐＨ１．５、０～１５％メタノール（ｖ／ｖ）、流速０．８ｍｌ／ｍｉｎ、検出２１０ｎｍ）で測定し、評価した。

実施例１：メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８５６）の培養

下記の組成の液体培地にあらかじめブイヨン寒天プレートに生育させた菌体を接種し３０℃、４０時間振とう培養してＤ－アミノアシラーゼの活性を有する菌体を得た。

（培地組成）

Ｎ－アセチル―ＤＬ－ロイシン：５ｇ／Ｌ

グルコース：　１０ｇ／Ｌ

ペプトン：１０ｇ／Ｌ

リン酸２水素カリウム：１ｇ／Ｌ

リン酸１水素カリウム：１ｇ／Ｌ

硫酸マグネシウム７水和物：０．１ｇ／Ｌ

イーストエキス：０．５ｇ／Ｌ

ｐＨ７．０（ＫＯＨで調整）。

実施例２：ノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）（ＡＴＣＣ３５８６３）の培養

下記の組成の液体培地にあらかじめブイヨン寒天プレートに生育させた菌体を接種し３０℃、１００時間振とう培養してＤ－アミノアシラーゼの活性を有する菌体を得た。

（培地組成）

Ｎ－アセチル―ＤＬ－ロイシン：５ｇ／Ｌ

Ｃｚａｐｅｋ－Ｄｏｘ　Ｌｉｑｕｉｄ ｍｅｄｉｕｍ　ｍｏｄｉｆｉｅｄ（Ｏｘｏｉｄ）：５ｇ／Ｌ

イーストエキス：２ｇ／Ｌ

ビタミンアッセイカザミノ酸：１０ｇ／Ｌ

ｐＨ　７．２（ＫＯＨで調整）。

実施例３：メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８５６）及びノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）（ＡＴＣＣ３５８６３）

由来Ｄ－アミノアシラーゼの基質濃度と反応速度の相関性

（粗酵素溶液）

実施例１及び２で示した方法により得られたメチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８５６）及びノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）（ＡＴＣＣ３５８６３）を用いて菌体溶液（０．１ｇ／０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）１ｍｌ）を調製し、超音波菌体破砕機により破砕、冷却遠心機にて破砕菌体を沈殿させた上清を粗酵素溶液とする。

（基質溶液）

Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が２００ｇ／ｌとなるように０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）に溶解したものを基質溶液とした。

（測定）

基質溶液を０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）で容量希釈して５、２５、５０、１００ｇ／ｌの基質溶液を２００μｌ調製した。粗酵素溶液を２００μｌ添加、３０℃で１時間反応後、１Ｍリン酸０．４ｍｌを添加して反応を停止した。１Ｎ水酸化ナトリウム０．４ｍｌを添加して析出した未反応アセチル体を溶解し、遠心分離にて菌体破砕物除去後、反応液中の生成Ｄ－トリプトファンをＨＰＬＣにて測定した。基質濃度５ｇ／ｌとしたときの反応速度を１００とし、２５、５０、１００ｇ／ｌとしたときの各菌株由来のＤ－アミノアシラーゼによるＤ－トリプトファン生成速度の相対値を表２に示す。

表２

Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファン濃度（ｇ／ｌ）	メチロバクテリウム　メソフィリカム（FERM BP-17771）	ノカルディオイデス　サーモリラシナス（ATCC 35863）
５	１００	１００
２５	１２２	１１０
５０	９１	１０８
１００	４２	１０３

比較例１：公知の菌株由来Ｄ－アミノアシラーゼの基質濃度と反応速度の相関性

公知のＤ－アミノアシラーゼ保有菌株であるアルカリゲネス　デニトリフィカンス　サブスウピーシーズ　キシロースオキシダンス　ＭＩ４（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ　ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ　ｓｕｂｓｐ．ｘｙｌｏｓｏｄａｎｓ　ＭＩ４）（ＦＥＲＭ　Ｐ－９４１３）、ストレプトマイセス　ツイルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｔｕｉｒｕｓ）（ＩＦＯ１３４１８）由来のＤ－アミノアシラーゼの基質濃度と反応速度の関係について調べた。それぞれの菌株の調製方法について以下に記す。アルカリゲネス　デニトリフィカンス　サブスウピーシーズ　キシロースオキシダンス　ＭＩ４（Ａｌｃａｌｉｇｅｎｅｓ　ｄｅｎｉｔｒｉｆｉｃａｎｓ　ｓｕｂｓｐ．ｘｙｌｏｓｏｄａｎｓ　ＭＩ４）（ＦＥＲＭ　Ｐ－９４１３）は実施例１記載の方法と同様に行なった。ストレプトマイセス　ツイルス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｔｕｉｒｕｓ）（ＩＦＯ１３４１８）は下記の組成の液体培地にて３０℃で４８時間培養を行なった。

（培地組成）

Ｄ－バリン：４ｇ／Ｌ

グルコース：１０ｇ／Ｌ

ペプトン：１０ｇ／Ｌ

リン酸２水素カリウム：１ｇ／Ｌ

リン酸１水素カリウム：１ｇ／Ｌ

硫酸マグネシウム７水和物：０．５ｇ／Ｌ

イーストエキス：１０ｇ／Ｌ

塩化コバルト：１ｍｇ／ｍｌ

ｐＨ７．０（ＫＯＨで調整）

粗酵素液の調製方法、基質液の調製方法、酵素活性の測定方法は実施例３に記載の通りに行なった。基質濃度５ｇ／１としたときの反応速度を１００とし、２５、５０、１００ｇ／１としたときの各菌株由来のＤ－アミノアシラーゼによるＤ－トリプトファン生成速度の相対値を表３に示す。

表3

Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファン濃度（ｇ／ｌ）	アルカリゲネス デニトリフィカンス サブスウピーシーズ キシロースオキシダンス ＭＩ４（ＦＥＲＭ Ｐ－９４１３）	ストレプトマイセス ツイルス（ＩＦＯ１３４１８）
５	１００	１００
２５	３６	４５
５０	１３	２２
１００	４	６

実施例４：メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ Ｐ－１７７７１）由来Ｄ－アミノアシラーゼのＮ末端アミノ酸配列決定

実施例１に示される方法でメチロバクテリウム　メソフィリカムを培養して菌体を回収し、１ｍＭ　ＤＴＴ（Dithiothreitol）を添加した０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）に懸濁した。懸濁液の状態で超音波破砕機によって菌体を破砕し、冷却遠心分離にて菌体破砕物を除去し、粗酵素溶液を得た。この粗酵素溶液に対して硫安を添加し、３０～６０％の沈殿画分を脱塩後、ＤＥＡＥトヨパールカラムに通してパス画分を回収した。この画分をさらにフェニルトヨパール、Ｑ－セファロースによるクロマトグラフィーに供し、Ｄ－アミノアシラーゼ活性を持つ画分を得た。この画分についてドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、分子量約５６ｋＤａの位置にバンドを確認した。この５６ｋＤａタンパク質についてＮ末端アミノ酸配列の分析を行ったところ、配列番号：３に示す様にThr-Asp-Ser-Thr-Arg-と決定された。

実施例５：メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobactrium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ Ｐ－１７７７１）のゲノミックＤＮＡライブラリー作成

実施例１に示した培養方法でメチロバクテリウム　メソフィリカム

(Methylobactrium mesophilicum) を２日間培養し、遠心分離で菌体を回収し、リン酸バッファー（ｐＨ７．８）で洗浄した。この菌体より「基礎生化学実験法２　抽出・分離・精製　阿南功一他著　丸善株式会社出版」記載によるバクテリアゲノムＤＮＡの分離方法に従い、ゲノムＤＮＡを調製した。調製したゲノムＤＮＡを制限酵素 Sac Ｉで完全消化して超遠心分離法にてＤＮＡの長さによって分画し、３ｋｂ以上のＤＮＡを回収した。それらのＤＮＡと、制限酵素 SacI で消化して５’末端を脱リン酸化したベクターｐＵＣ１８とをＤＮＡ連結反応に供し、プラスミドライブラリーを作成した。このプラスミドライブラリーによって大腸菌ＤＨ５αを形質転換したものを５０μｇ/ｍｌのアンピシリンを添加したＬＢ（Luria-Bertani）アガロース培地に塗布して静置培養し、コロニーを出現させた。

実施例６：プラスミドライブラリーからのＤ－アミノアシラーゼ活性スクリーニング

実施例５で出現した個々のコロニーをＬＢ培地（１％バクトトリプトン、０．５％バクトイーストエキストラクト、１％塩化ナトリウム、ｐＨ７．０）で３７℃一晩液体振盪培養し、遠心分離によって形質転換体を沈殿させ、０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）にて一回洗浄後、再び遠心分離にて菌体を回収した。回収した菌体を破砕したものを粗酵素溶液とし、基質であるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンと反応させてＤ－トリプトファンを生成するＤ－アミノアシラーゼ活性を有する形質転換体を選抜した。以下にその測定法を示す。

（粗酵素溶液）

上記回収菌体を０．１ｍｇ/ｍｌの濃度になるように０．１Ｍのリン酸バッファー（ｐＨ７．８）に懸濁し、超音波菌体破砕機にて菌体を破砕した後、冷却遠心機にて破砕菌体を沈殿させた上清を粗酵素溶液とした。

（基質溶液）

Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１０ｇ／ｌとなるように０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）に溶解したものを基質溶液とした。

（測定）

基質溶液２００μｌに対し粗酵素溶液２００μｌ添加、３０℃、１時間反応後、１Ｍリン酸０．４ｍｌを添加して反応を停止した。遠心分離にて菌体破砕物除去後、

反応液中の生成Ｄ－トリプトファンをＨＰＬＣにて測定した。

実施例７：Ｄ－アミノアシラーゼ遺伝子をコードするＤＮＡの塩基配列決定

実施例６より得られたＤ－アミノアシラーゼ活性を有する形質転換体よりプラスミドを抽出し、その物理的地図を調べたところ、図１の様であることが判明した。さらにその塩基配列の解析を行った。塩基配列の決定はPE Applied Biosystems 社、BigDye Teminator Cycle Sequencing kit を用い、同社製Genetic Analyzer 310 にて行った。その結果配列番号１に示すＤ－アミノアシラーゼ遺伝子をコードするＤＮＡの塩基配列が得られた。該Ｄ－アミノアシラーゼ遺伝子の塩基配列をアミノ酸翻訳したものを配列番号２に示す。そのＮ末端のアミノ酸配列は実施例２に示したＮ－末端アミノ酸配列分析の結果と一致した。また、該アミノ酸配列からＤ－アミノアシラーゼの分子量は約５３ｋＤａと推定された。

実施例８：メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ Ｐ－１７７７１）由来Ｄ－アミノアシラーゼ遺伝子を含むＤＮＡによって形質転換した大腸菌を用いたＮ－アセチル－ＤＬ－トリプトファンを基質としたときの反応評価

（菌体懸濁液の調製）

実施例７の図１で示されるプラスミドで形質転換した大腸菌をアンピシリン（５０μｇ／ｍｌ）を含むＬＢ培地で終夜３７℃振とう培養を行なった。培養後、遠心分離により集菌、０．１Ｍのリン酸バッファー（ｐＨ７．８）で洗浄後に菌体を０．１Ｍのリン酸バッファー（ｐＨ７．８）に懸濁した。

（Ｎ－アセチル－ＤＬ－トリプトファン溶液の調製）

Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が２００ｇ／ｌとなるように０．１Ｍリン酸バッファー（ｐＨ７．８）に溶解したものを基質溶液とした。

（測定）

上記菌体懸濁液２．５ｍｌと基質溶液２．５ｍｌをあらかじめ４０℃に保温し、この２つの溶液を混合した後４０℃で反応を行った（反応基質濃度：１００ｇ／ｌ）。反応開始２０時間後に反応液１００μｌを採取し、同量の１ＮＮａＯＨを添加して反応を停止した。その後、ＨＰＬＣ移動相で１／２００に希釈して、遠心分離によって菌体を沈殿させ、上清をＨＰＬＣによって分析し、生成したＤ－およびＬ－ト

リプトファン、そして基質であるＮ－アセチル－ＤＬ－トリプトファンの濃度を測定した。その結果を表４に示す。

表４

生成Ｄ－トリプトファン［mM］	１８４
生成Ｌ－トリプトファン［mM］	０．０
残存Ｎ－アセチル－ＤＬ－トリプトファン［mM］	２１８
Ｄ－トリプトファン収率［％］	４５．８　＊
Ｄ－トリプトファン光学純度［％ｅ．ｅ．］	１００

＊（生成Ｄ－トリプトファン［mM］）÷（生成Ｄ－トリプトファン［mM］+生成Ｌ－トリプトファン［mM］+残存Ｎ－アセチル－ＤＬ－トリプトファン［mM］）。

実施例９：メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８５６）由来Ｄ－アミノアシラーゼ遺伝子を含むＤＮＡによって形質転換した大腸菌のＮ－アセチル－ＤＬ－アミノ酸に対する基質特異性

実施例７の図１で示されるプラスミドで形質転換した大腸菌のＮ－アセチル－ＤＬ－アミノ酸に対する基質特異性を比較した。本実施例においては、基質であるＮ－アセチル－ＤＬ－アミノ酸濃度を５ｇ／１に設定して４０℃で１６時間反応を行った。Ｎ－アセチル－ＤＬ－トリプトファンを基質とした時のＤ－アミノアシラーゼ活性を１００として、各種Ｎ－アセチル－ＤＬ－アミノ酸に対する相対活性を、またその時の光学純度及び反応収率を求めた。その結果を表５に示す。

表5

基質	相対活性（%）	光学純度（%ee）／D－トリプトファン収率（%）*
N－アセチル－DL－トリプトファン	１００	１００%ee／５０%
N－アセチル－DL－5－ヒドロキシトリプトファン	８０	９９%ee／４８%
N－アセチル－DL－フェニルアラニン	１０４	９９%ee／５０%
N－アセチル－DL－ホモフェニルアラニン	４５	１００%ee／４８%
N－アセチル－DL－4－フルオロフェニルアラニン	９９	９８%ee／５０%
N－アセチル－DL－4－クロロフェニルアラニン	８９	９８%ee／４９%
N－アセチル－DL－チロシン	６７	１００%ee／４８%
N－アセチル－DL－o－ベンジルセリン	３０	１００%ee／４８%

（生成D－アミノ酸［mM］）÷（生成D－アミノ酸［mM］+生成L－アミノ酸［mM］+残存N－アセチル－DL－アミノ酸［mM］）

産業上の利用可能性

本発明により、メチロバクテリウム　メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）ＭＴ１０８９４（ＦＥＲＭ　ＢＰ－７８５６）などに由来する新規なD－アミノアシラーゼ及びそれをコードするＤＮＡが提供される。本発明のD－アミノアシラーゼは産業上の有用性に優れた酵素であり、N－アシルアミノ酸から対応するD－アミノ酸を高効率で製造することができる。

請 求 の 範 囲

1． Ｎ－アシル－Ｄ－アミノ酸に作用して対応するＤ－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有するＤ－アミノアシラーゼであって、

水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際におけるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％である事を特徴とするＤ－アミノアシラーゼ。

2． Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である請求項１記載のＤ－アミノアシラーゼ。

3． メチロバクテリウム（Methylobacterium）属又はノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物由来である請求項１に記載のＤ－アミノアシラーゼ。

4． メチロバクテリウム（Methylobacterium）属に属する微生物がメチロバクテリウム・メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）種、ノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種である請求項３記載のＤ－アミノアシラーゼ。

5． ノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）ＡＴＣＣ３５８６３株である請求項４記載のＤ－アミノアシラーゼ。

6． Ｎ－アシル－Ｄ－アミノ酸に作用して対応するＤ－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有するＤ－アミノアシラーゼであって、

（Ａ）配列表の配列番号：２記載のアミノ酸配列または

（Ｂ）該アミノ酸配列に対して前記触媒活性を維持し得る範囲内で１以上のアミノ酸残基の挿入、欠失または置換を行って得られる変異アミノ酸配列

を有することを特徴とするＤ－アミノアシラーゼ。

7． 水性媒体中でN－アセチル－D－トリプトファンからD－トリプトファンを生成する反応を触媒する際におけるN－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％である請求項６に記載のD－アミノアシラーゼ。

8． N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である請求項７に記載のD－アミノアシラーゼ。

9． N－アシル－D－アミノ酸に作用して対応するD－アミノ酸を生成する反応を触媒する作用を有するD－アミノアシラーゼをコードする塩基配列であって、

（a）配列表の配列番号：１記載の塩基配列または

（b）配列番号：１の塩基配列に対して該塩基配列がコードするD－アミノアシラーゼの作用が維持される範囲内で１以上の塩基の挿入、欠失または置換を行って得られる変異塩基配列

からなることを特徴とするD－アミノアシラーゼをコードする塩基配列。

１０． 前記変異塩基配列が、前記配列番号：１の塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするものである請求項９に記載の塩基配列。

１１． D－アミノアシラーゼが水性媒体中でN－アセチル－D－トリプトファンからD－トリプトファンを生成する反応を触媒する際のN－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％である請求項９に記載の塩基配列。

１２． N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、N－アセチル－D－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である請求項１１に記載の塩基配列。

１３． 請求項９に記載の塩基配列を含むプラスミド。

１４． 請求項１３に記載のプラスミドによって形質転換された形質転換体。

１５． 請求項１４に記載の形質転換体を培養して、該形質転換体に組み込まれたプラスミドの有する塩基配列によりコードされたD－アミノアシラーゼを生産さ

せることを特徴とするＤ－アミノアシラーゼの産生方法。

１６．　水性媒体中でＮ－アシルアミノ酸にＤ－アミノアシラーゼを作用させて対応するＤ－アミノ酸を生産する光学活性アミノ酸の生産方法であって、該Ｄ－アミノアシラーゼが水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際におけるＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％であることを特徴とする光学活性アミノ酸の生産方法。

１７．　Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である請求項１６記載の生産方法。

１８．　メチロバクテリウム（Methylobacterium）属又はノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物由来である請求項１６に記載の生産方法。

１９．　メチロバクテリウム（Methylobacterium）属に属する微生物がメチロバクテリウム・メソフィリカム（Methylobacterium mesophilicum）種、ノカルディオイデス（Nocardioides）属に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種である請求項１８記載の生産方法。

２０．　ノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）種に属する微生物がノカルディオイデス・サーモリラシナス（Nocardioides thermolilacinus）ＡＴＣＣ３５８６３株である請求項１９記載の生産方法。

２１．　Ｎ－アシルアミノ酸濃度が５０ｇ／１以上である請求項１６に記載の製造方法。

２２．　Ｎ－アシルアミノ酸濃度が１００ｇ／１以上である請求項２１記載の製造方法。

２３．　水性媒体中でＮ－アシルアミノ酸にＤ－アミノアシラーゼを作用させて対応するＤ－アミノ酸を生産する光学活性アミノ酸の生産方法であって、該Ｄ－アミノアシラーゼが請求項６に記載のＤ－アミノアシラーゼであることを特徴とする光学活性アミノ酸の生産方法。

２４．　前記Ｄ－アミノアシラーゼが水性媒体中でＮ－アセチル－Ｄ－トリプト

ファンからＤ－トリプトファンを生成する反応を触媒する際のＮ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５０ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも４０％である請求項２３に記載の生産方法。

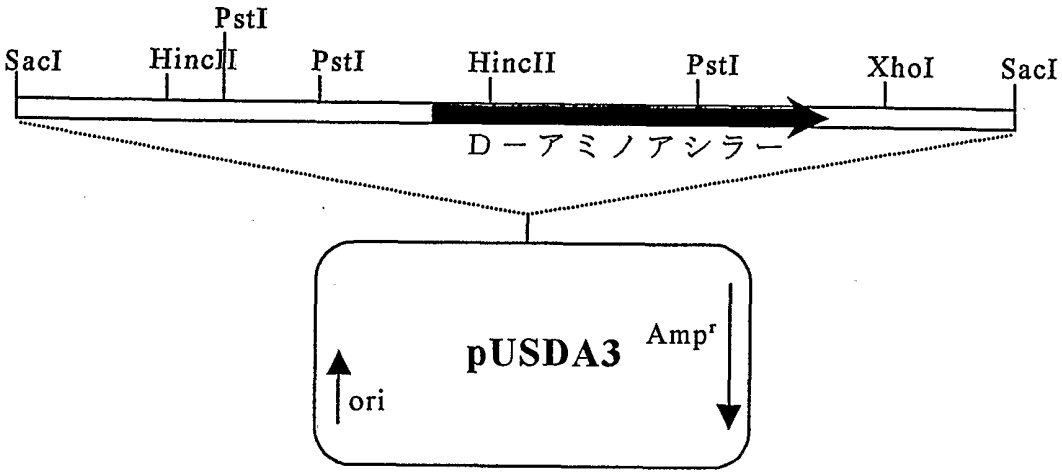
２５．　Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が１００ｇ／１の場合の反応速度が、Ｎ－アセチル－Ｄ－トリプトファンの濃度が５ｇ／１の場合の反応速度に対して少なくとも２０％である請求項２４に記載の生産方法。

２６．　Ｄ－アミノアシラーゼを、請求項１４に記載の形質転換体を培養して得られる培養液、該培養液から分離された形質転換体又はそれらの処理物の形でＮ－アシルアミノ酸に作用させる請求項２３に記載の生産方法。

２７．　基質となるＮ－アシルアミノ酸濃度が５０ｇ／１以上である請求項２３に記載の製造方法。

２８．　基質となるＮ－アシルアミノ酸濃度が１００ｇ／１以上である請求項２７記載の製造方法。

Fig. 1


PstI
SacI
HincII
PstI
HincII
PstI
XhoI
SacI
D－アミノアシラー
pUSDA3
Amp^r
ori

配列表

<110> Mitsui Chemicals Inc.

<120> DNA encoding a new D-aminoacylase and method of producing thereof using the same

<130> MTC02P014

<160> 3

<210> 1

<211> 1464

<212> DNA

<213> Methylobacterium mesophilicum

<400> 1

atgaccgaca gcacccgtaa gcacgacctg atcatccgcg gcggcaccgt catcgacggc 60
cgccggacgc cccgcttccg cgccgatgtg gcggtgcgcg acggccgact gagcgccatc 120
ggcgatctgg cggaccatcg ggccgcccag gagatcgatg ccacgggacg catcgtggcg 180
ccgggcttca tcgactcgca cacgcacgat gaccaggcgg tgctgtcgca gccgcagatc 240
ccgttcaagg tgtcgcaggg cgtcacgacg gtgatcgccg gcaattgcgg catcagcgcg 300
gcgccgctgc ggcgggacat ggacctgccc atgcccctca acctgatcga cgtgcccgcc 360
gaggagcgct tcacccgctt cgccgactac ctggatgcgc tgcgtgcccg cccctcgtcg 420
gtcaacgtgg ccgcgatggt cggccactcc accctgcgcg ccgtcaccat gccggcgctg 480
gaccgcgagg ccaacagcga ggaaatcgca cgcatgcgcg cgctggtgca ggaggcgatg 540
gacgcgggcg ccatcggcgt ctccaccggc accttctatc cacccgcggt gaaggccacc 600
acggaggaga tcatcgaagt ctgccggccc ctcactgccg cgggggcct gtacgtcacc 660
cacatgcggg acgagtccga ccaggtgatg acctcgctgg aagagacctt ccgcatcggc 720
cgcgcgctgg acgtgccggt ggtcgtctcc caccacaaag tgcagaacac gcccaacttc 780
ggcaagtcgc aggtcacgct gcccttcatc cgcgaagcca tgcaacgcca gcgcagtgtg 840
cctcgactgc tatccctaca cggcgggctc gaccatgatc cgcgcggacc ggggcatgct 900
cgaaggccgc gtgctgatcg ccgagagcct gccgcatccg gaatgcgcag gccgcgacct 960
ggacgacatc gcccgcgact ggggcgtgac cgggtggagg ccgcccgccg gctgcagccc 1020
ggcagcgcca tctacttcct gatggacgag ggcgatgtgc agcgcatcct ggccttcgac 1080
gacacgatga tcggctcgga cggcatcccg gtcggcagca agccgcatcc gcggctctgg 1140
ggcaccttcc cgcgcgtgct gggccattac agccgcgacg tcggcctgtt ccccctggag 1200
accgccgtct ggaagatgac cggactcacg gcccgcaact tcggcctgca cggccggggc 1260

acgctggagg ccggccaggc cgccgacatc gtggtcttcg atgccggcac cgtgcgcgac 1320
gcggccgact atgccgagcc cacgcgtccc gcggaaggca tcgatgcggt gatcgtcaat 1380
ggcgccatca cctggcaagg cggccagcac acgggcgcac gccagggtca ggtcatccgc 1440
cgccaggcgg ccccatccca ctga 1464

<210> 2

<211> 487

<212> PRT

<213> Methylobacterium mesophilicum

<400> 2

Met Thr Asp Ser Thr Arg Lys His Asp Leu Ile Ile Arg Gly Gly Thr
1 5 10 15
Val Ile Asp Gly Arg Arg Thr Pro Arg Phe Arg Ala Asp Val Ala Val
20 25 30
Arg Asp Gly Arg Leu Ser Ala Ile Gly Asp Leu Ala Asp His Arg Ala
35 40 45
Ala Gln Glu Ile Asp Ala Thr Gly Arg Ile Val Ala Pro Gly Phe Ile
50 55 60
Asp Ser His Thr His Asp Asp Gln Ala Val Leu Ser Gln Pro Gln Ile
65 70 75 80
Pro Phe Lys Val Ser Gln Gly Val Thr Thr Val Ile Ala Gly Asn Cys
85 90 95
Gly Ile Ser Ala Ala Pro Leu Arg Arg Asp Met Asp Leu Pro Met Pro
100 105 110
Leu Asn Leu Ile Asp Val Pro Ala Glu Glu Arg Phe Thr Arg Phe Ala
115 120 125
Asp Tyr Leu Asp Ala Leu Arg Ala Arg Pro Ser Ser Val Asn Val Ala
130 135 140
Ala Met Val Gly His Ser Thr Leu Arg Ala Val Thr Met Pro Ala Leu
145 150 155 160
Asp Arg Glu Ala Asn Ser Glu Glu Ile Ala Arg Met Arg Ala Leu Val
165 170 175
Gln Glu Ala Met Asp Ala Gly Ala Ile Gly Val Ser Thr Gly Thr Phe

180 185 190

Tyr Pro Pro Ala Val Lys Ala Thr Thr Glu Glu Ile Ile Glu Val Cys

195 200 205

Arg Pro Leu Thr Ala Ala Gly Gly Leu Tyr Val Thr His Met Arg Asp

210 215 220

Glu Ser Asp Gln Val Met Thr Ser Leu Glu Glu Thr Phe Arg Ile Gly

225 230 235 240

Arg Ala Leu Asp Val Pro Val Val Val Ser His His Lys Val Gln Asn

245 250 255

Thr Pro Asn Phe Gly Lys Ser Gln Val Thr Leu Pro Phe Ile Arg Glu

260 265 270

Ala Met Gln Arg Gln Arg Ser Val Pro Arg Leu Leu Ser Leu His Gly

275 280 285

Gly Leu Asp His Asp Pro Arg Gly Pro Gly His Ala Arg Arg Pro Arg

290 295 300

Ala Asp Arg Arg Glu Pro Ala Ala Ser Gly Met Arg Arg Pro Arg Pro

305 310 315 320

Gly Arg His Arg Pro Arg Leu Gly Arg Asp Arg Val Glu Ala Ala Arg

325 330 335

Arg Leu Gln Pro Gly Ser Ala Ile Tyr Phe Leu Met Asp Glu Gly Asp

340 345 350

Val Gln Arg Ile Leu Ala Phe Asp Asp Thr Met Ile Gly Ser Asp Gly

355 360 365

Ile Pro Val Gly Ser Lys Pro His Pro Arg Leu Trp Gly Thr Phe Pro

370 375 380

Arg Val Leu Gly His Tyr Ser Arg Asp Val Gly Leu Phe Pro Leu Glu

385 390 395 400

Thr Ala Val Trp Lys Met Thr Gly Leu Thr Ala Arg Asn Phe Gly Leu

405 410 415

His Gly Arg Gly Thr Leu Glu Ala Gly Gln Ala Ala Asp Ile Val Val

420 425 430

Phe Asp Ala Gly Thr Val Arg Asp Ala Ala Asp Tyr Ala Glu Pro Thr

435 440 445

Arg Pro Ala Glu Gly Ile Asp Ala Val Ile Val Asn Gly Ala Ile Thr

450 455 460

Trp Gln Gly Gly Gln His Thr Gly Ala Arg Gln Gly Gln Val Ile Arg

465 470 475 480

Arg Gln Ala Ala Pro Ser His

485

<210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Methylobacterium mesophilicum

<400> 3

Thr Asp Ser Thr Arg

1 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/00853

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C12N15/09, C12N9/80, C12N5/10, C12P13/04

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[7] C12N15/09, C12N9/80, C12N5/10, C12P13/04

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)
REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICST FILE(JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 00/23598 A1 (Chirotech Technology Ltd.), 27 April, 200 (27.04.00), Full text & AU 9962227 A & EP 1121446 A1 & KR 2001075649 A	1-28
A	WO 00/78926 A1 (Amano Enzyme), 28 December, 2000 (28.12.00), Full text & JP 2001-000185 A	1-28
A	WAKAYAMA, M. et al., Cloning and Sequencing of a Gene Encoding D-Aminoacylase from Alcaligenes xylosoxydans subsp. xylosoxydans A-6 and Expression of the Gene in Escherichia coli, Biosci. Biotech. Biochem., 1995, Vol.59, No.11, pages 2115 to 2119	1-28

☒ 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	Date of mailing of the international search report
10 April, 2002 (10.04.02)	23 April, 2002 (23.04.02)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP02/00853

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WAKAYAMA, M. et al., Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of the N-Acyl-D-Aspartate Amidohydrolase Gene from Alcaligenes xylosoxydans subsp. Xylosoxydans A-6, Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, Vol.80, No.4, pages 311 to 317	1-28
A	WAKAYAMA, M. et al., Primary Structure of N-Acyl-D-Glutamate Amidohydrolase from Alcaligenes xylosoxydans subsp. xylosoxydans A-6, J. Biochem., 1995, Vol.118, pages 204 to 209	1-28

国際調査報告

国際出願番号　PCT／JP02／00853

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））
Int.Cl[7]　C12N 15/09, C12N 9/80, C12N 5/10, C12P 13/04

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[7]　C12N 15/09, C12N 9/80, C12N 5/10, C12P 13/04

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）
REGISTRY(STN), CA(STN), MEDLINE(STN), WPI(DIALOG), BIOSIS(DIALOG), JICSTファイル(JOIS),
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

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	WO 00/23598 A1(CHIROTECH TECHNOLOGY LTD)2000.04.27., 全文 & AU 9962227 A & EP 1121446 A1 & KR 2001075649 A	1-28
A	WO 00/78926 A1(天野エンザイム)2000.12.28., 全文 & JP 2001-000185 A	1-28
A	WAKAYAMA, M. et al., Cloning and Sequencing of a Gene Encoding D-Aminoacylase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6 and Expression of the Gene in *Escherichia coli*, Biosci. Biotech. Biochem., 1995, Vol. 59, No. 11, p. 2115-2119	1-28

☒ 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」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	国際調査報告の発送日
10.04.02	23.04.02

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ISA／JP） 郵便番号100－8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	上條　肇	4B	3038
	電話番号　03－3581－1101　内線　3448		

様式PCT／ISA／210（第2ページ）（1998年7月）

Ｃ（続き）．　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	WAKAYAMA, M. et al., Cloning, Expression, and Nucleotide Sequence of the N-Acyl-D-Aspartate Amidohydrolase Gene from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6, Journal of Fermentation and Bioengineering, 1995, Vol. 80, No. 4, p. 311-317	1-28
A	WAKAYAMA, M. et al., Primary Structure of N-Acyl-D-Glutamate Amidohydrolase from *Alcaligenes xylosoxydans* subsp. *xylosoxydans* A-6, J. Biochem., 1995, Vol. 118, p. 204-209	1-28