



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 C12P 13/04, C12N 15/54 // (C12P 13/04, C12R 1:06) (C12N 15/54, C12R 1:19)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/48030</p> <p>(43) 国際公開日 1998年10月29日(29.10.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/01814</p> <p>(22) 国際出願日 1998年4月20日(20.04.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/121732 1997年4月23日(23.04.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 鐘淵化学工業株式会社(KANEKA CORPORATION)[JP/JP] 〒530-8288 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4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)</p> <p>山田勇喜雄(YAMADA, Yukio)[JP/JP] 〒675-0334 兵庫県加古川市志方町成井368-7 Hyogo, (JP)</p> <p>岩崎 晃(IWASAKI, Akira)[JP/JP] 〒674-0083 兵庫県明石市魚住町住吉一丁目10-26 Hyogo, (JP)</p> <p>木崎憲之(KIZAKI, Noriyuki)[JP/JP] 〒676-0026 兵庫県高砂市高砂町沖浜町2-63 Hyogo, (JP)</p> <p>松本圭司(MATSUMOTO, Keiji)[JP/JP] 〒663-8023 兵庫県西宮市大森町11-33 Hyogo, (JP)</p> <p>池中康裕(IKENAKA, Yasuhiro)[JP/JP] 〒651-2242 兵庫県神戸市西区井吹台東町五丁目21-3 Hyogo, (JP)</p>	<p>小倉正博(OGURA, Masahiro)[JP/JP] 〒675-1345 兵庫県小野市黍田町857 Hyogo, (JP)</p> <p>長谷川淳三(HASEGAWA, Junzo)[JP/JP] 〒674-0057 兵庫県明石市大久保町高丘二丁目13-4 Hyogo, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 細田芳徳(HOSODA, Yoshinori) 〒540-0012 大阪府大阪市中央区谷町二丁目8番1号 大手前M2ビル 細田国際特許事務所 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54)Title: PROCESS FOR PRODUCING OPTICALLY ACTIVE AMINO COMPOUNDS</p> <p>(54)発明の名称 光学活性アミノ化合物の製造方法</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A process for efficiently producing optically active amino compounds, mainly (R)-amino compounds, at a low cost by means of a microbial enzyme; a polypeptide suitable for use in the production process and having a stereoselective transaminase activity; and a DNA coding for the polypeptide. The process is characterized by comprising causing a transaminase to act on a ketone compound as an amino acceptor in the presence of a primary amine as an amino donor to stereoselectively transfer the amino group to thus obtain an optically active amino compound. The DNA contains a base sequence coding for a polypeptide having a stereoselective transaminase activity. The polypeptide can be obtained by incubating a microorganism belonging to the genus <i>Arthrobacter</i>.</p>		

(57)要約

微生物酵素による(R)-アミノ化合物を主とする光学活性アミノ化合物の効率的かつ安価な製造方法、該製造方法に好適に使用可能な立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードするDNAを提供すること。ケトン化合物をアミノ基受容体とし、アミノ基供与体である第一アミンの存在下、トランスアミナーゼを作用させて立体選択的にアミノ基転移を行わせることにより、光学活性アミノ化合物を得ることを特徴とする、光学活性アミノ化合物の製造方法、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有してなるDNA、及びアルスロバクター属に属する微生物の培養により得ることのできる、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド。

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)

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

明 細 書

光学活性アミノ化合物の製造方法

技術分野

本発明は、医薬品や農薬等の中間体として用いられる1位にアリール基等を有する光学活性なアミノ化合物に関する。本発明の目的化合物の1つである1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンは、開発中の抗糖尿病薬、抗肥満薬として有望なCL 316、243 (J. D. Bloom ら、J. Med. Chem., 35, 3081-3084 (1992))やその類縁化合物の中間体として重要な化合物である。

また、別の目的化合物である(S)-2-アミノ-1-メトキシプロパンは除草剤中間体として用いることができる有用化合物である。

背景技術

酵素を用いて1位にアリール基等を有する光学活性なアミノ化合物を製造する方法としては、中道らの報告 (Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 634-640 (1990)) 及び特公平4-11194号公報が挙げられる。これらは1-(置換フェニル)-2-プロパノン類にアミノ基を酵素的に転移させることによって(S)体を効率的に合成できることを開示している。さらに、特公平4-11194号公報には(R)体の合成についても記載があるが、(R)体については、本発明者らが特公平4-11194号公報に記載のある微生物および基質について追試を行ったところ、非常に再現性に乏しく、実用化は困難であると考えられる。

更に、有機合成的に生産したラセミ体アミノ化合物に ω -アミノ酸トランスアミナーゼを作用させて(S)体のみを分解し、残った(R)体を取得する方法がスターリングら (特開平3-103192号公報) によって開示されているが、この方法では、(R)体を取得するために(S)体を分解してしまう為、基質に

対する収率が50%以下に低下し、コスト的には有利な方法とは言えない。また、同じくスターリングらは ω -アミノ酸トランスアミナーゼを用いて、ケトン体からアミノドナーの存在下に(S)-アミノ化合物のみを合成する方法をも開示しているが、この方法では光学活性な(R)-アミノ化合物を合成することはできない。

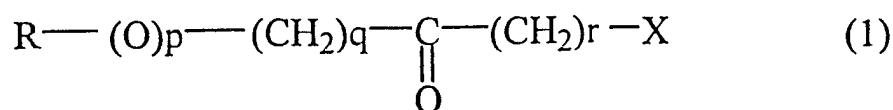
発明の開示

従って、本発明の目的は、微生物酵素による(R)-アミノ化合物を主とする光学活性アミノ化合物の効率的かつ安価な製造方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、かかる製造方法に好適に用いることのできる立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、及び該ポリペプチドをコードするDNAを提供することにある。

本発明者らは1位にアリール基を有するケトン化合物等に、例えば、1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノンに(R)体選択的にアミノ基を転移させることによって、収率良く(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンのような光学活性アミノ化合物を合成できる微生物を土壌より発見し、これを用いる反応の検討をすることによって、種々の光学活性アミノ化合物(一般式(2))のような立体配置であり、得られる多くの化合物は上記のような(R)体であるが、不斉炭素に結合する置換基の関係で、例えば、(S)-2-フェニルグリシノールのように(S)体の物もある。)を合成できる微生物を土壌より発見し、これを用いる反応を検討すると共に、該反応に関与する酵素(以下、トランスアミナーゼと呼ぶ。)の遺伝子を単離し、大腸菌等を宿主とした組換え微生物を用いて更に安価にトランスアミナーゼを製造する方法を検討することによって、本発明を完成させた。

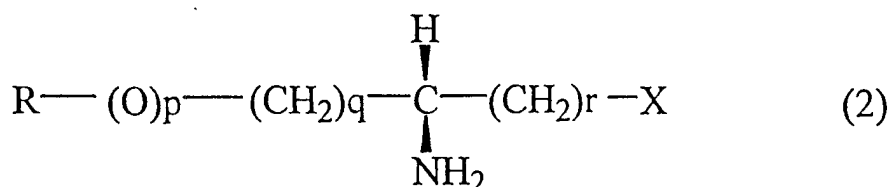
即ち、本発明の要旨は、

(1) 一般式(1)



(式中、pは0または1を示し、qは0～8の整数を示し、rは0～4の整数を示し、Rは炭素数6～14の置換または無置換のアリール基、炭素数4～12のヘテロアリール基、カルボシキル基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、メチル基、または水素原子のいずれかを示し、Xは水酸基、カルボシキル基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、または水素原子のいずれかを示す。)に示されるケトン化合物をアミノ基受容体とし、アミノ基供与体である第一アミンの存在下、トランスアミナーゼを作用させて立体選択的にアミノ基転移を行わせることにより、

一般式(2)



(式中、p、q、r、R、Xは、それぞれ一般式(1)におけるp、q、r、R、Xと同じである。)に示される立体配置を有する光学活性アミノ化合物を得ることを特徴とする、光学活性アミノ化合物の製造方法、

〔2〕 (R)体選択的にアミノ基転移を行い、(R)体の光学活性アミノ化合物を得る前記〔1〕記載の製造方法、

〔3〕 置換アリール基が、ハロゲン原子、炭素数1～6のアルキル基、水酸基、メトキシ基、モノフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、及びトリフルオ

ロメチル基からなる群より選択される一種以上の置換基により一ヶ所以上置換されたアリール基である、前記〔1〕又は〔2〕記載の製造方法、

〔4〕 Rがメチル基、フェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2,4-ジメトキシフェニル基、3,4-ジメトキシフェニル基、2-トリフルオロメチルフェニル基、3-トリフルオロメチルフェニル基、及び4-トリフルオロメチルフェニル基からなる群より選択される基である前記〔1〕～〔3〕いずれか記載の製造方法、

〔5〕 ヘテロアリール基がピリジル基、ピラジニル基、チエニル基、フリル基、及びチアゾリル基からなる群より選択される基である前記〔1〕又は〔2〕記載の製造方法、

〔6〕 pが0、qが1、rが1、Xが水素原子である前記〔1〕～〔5〕いずれか記載の製造方法、

〔7〕 第一アミンが、一般式（3）



（式中、R₁、R₂はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1～14の置換若しくは無置換のアルキル基、炭素数6～14の置換若しくは無置換のアリール基、炭素数1～14の置換若しくは無置換のアラルキル基、カルボキシル基、又は炭素数1～10のアルコキシカルボニル基を示し、R₁とR₂は分子内で結合して環を形成してもよい。）に示される化合物である前記〔1〕～〔6〕いずれか記載の製造方法、

〔8〕 R₁が炭素数1～10のアルキル基、フェニル基、又はナフチル基のいずれかであり、そしてR₂がメチル基、エチル基、ヒドロキシメチル基、ヒド

ロキシエチル基、カルボキシ基、炭素数1～10のアルコキシカルボニル基、又はカルボキシメチル基のいずれかである前記〔7〕記載の製造方法、

〔9〕 第一アミンが(R)体である前記〔1〕～〔8〕いずれか記載の製造方法、

〔10〕 第一アミンが、D-アラニンまたはアルキル基の炭素数が1～10である、D-アラニンのアルキルエステルである前記〔1〕～〔9〕いずれか記載の製造方法、

〔11〕 第一アミンが、(R)-1-フェニルエチルアミン、(R)-1-ナフチルエチルアミン、(R)-1-メチルプロピルアミン、(R)-1-メチルヘキシルアミン、(R)-2-アミノ-1-プロパノール、(R)-1-メチルブチルアミン、(R)-1-フェニルメチルアミン、(R)-1-アミノ-1-フェニルエタノール、(R)-2-アミノ-2-フェニルエタノール、(R)-3-アミノヘプタン、(R)-1-アミノ-3-フェニルプロパン、(R)-2-アミノ-4-フェニルブタン、(R)-2-アミノ-3-フェニルプロパノール、(R)-1-メチルヘプチルアミン、ベンジルアミン、(S)-2-フェニルグリシノール、(R)-3-アミノフェニルブタン、L-フェニルアラニノール、(R)-2-アミノ-1-メトキシプロパン、D-アラニンメチルエステル、(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパン、(R)-1-フェニル-2-アミノプロパン、もしくはD-アラニンエチルエステルである、またはこれらのラセミ体である、前記〔1〕～〔10〕いずれか記載の製造方法、

〔12〕 立体選択的にアミノ基転移を行わせる活性を有するトランスアミナーゼを生産する微生物の培養物、分離した菌体、菌体処理物、または固定化菌体と、ケトン化合物及び第一アミンとを接触させる前記〔1〕～〔11〕いずれか記載の製造方法、

〔13〕 立体選択的にアミノ基転移を行わせる活性を有するトランスアミナー

ゼを生産する微生物の無細胞抽出物、部分精製酵素、精製酵素、または固定化酵素と、ケトン化合物及び第一アミンとを接触させる前記〔1〕～〔11〕いずれか記載の製造方法、

〔14〕 トランスアミナーゼを生産する微生物がアルスロバクター (*Arthrobacter*) 属に属する微生物である前記〔12〕又は〔13〕記載の製造方法、

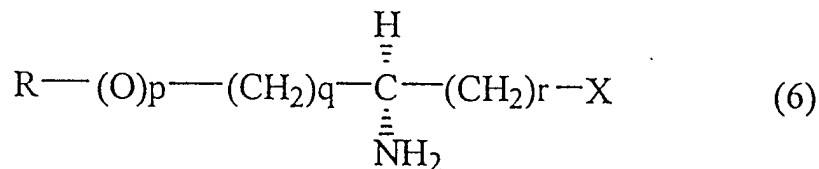
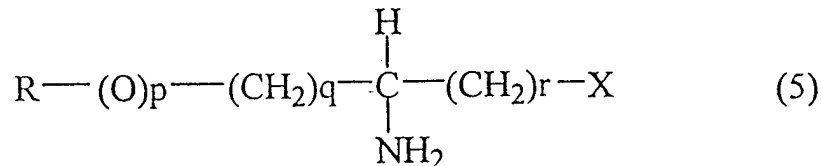
〔15〕 アルスロバクター属に属する微生物がアルスロバクター・スピーシーズ (*Arthrobacter* sp.) KNK168 (FERM BP-5228) である前記〔14〕記載の製造方法、

〔16〕 トランスアミナーゼを生産する微生物を培養する際に、該酵素の誘導物質として (RS)-1-メチルプロピルアミン、(RS)-1-フェニルエチルアミン、(RS)-1-メチルブチルアミン、(RS)-3-アミノ-2,2-ジメチルブタン、(RS)-2-アミノ-1-ブタノール、及び (R) または (RS)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンからなる群より選択される一種以上のアミン類を培地に添加する前記〔12〕～〔15〕いずれか記載の製造方法、

〔17〕 5～12の範囲のpHでトランスアミナーゼを作用させる前記〔1〕～〔16〕いずれか記載の製造方法、

〔18〕 反応促進物質としての界面活性剤又は脂肪酸を添加して、トランスアミナーゼを作用させる前記〔1〕～〔17〕いずれか記載の製造方法、

〔19〕 一般式(4)で示されるケトン化合物の存在下、一般式(5)で示されるラセミ体のアミノ化合物にトランスアミナーゼを作用させることにより、立体選択的にアミノ基転移反応を行い、一般式(6)で示される光学活性アミノ化合物



(式中、R、p、q、r、X、R₁、R₂ は一般式(1)、一般式(3)におけるR、p、q、r、X、R₁、R₂ と同じである。)を得る、光学活性アミノ化合物の製造方法、

〔20〕 立体選択的にアミノ基を転移させる活性(「立体選択的なトランスアミナーゼ活性」と略記する。)を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有してなるDNA、

〔21〕 ポリペプチドがアルスロバクター(*Arthrobacter*)属に属する菌株由来のものである前記〔20〕記載のDNA、

〔22〕 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列の全部又はその一部をコードするDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔23〕 配列表の配列番号：2に記載された塩基配列の全部又はその一部を含むDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプ

チドをコードするDNA、

〔24〕 配列表の配列番号：2に記載された塩基配列において、1個以上の塩基が欠失、付加、挿入、または置換された塩基配列からなるDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔25〕 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、または置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、

〔26〕 アルスロバクター属に属する微生物の培養により得ることのできる、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、

〔27〕 配列表の配列番号：3、配列番号：4、又は配列番号：6に記載された部分アミノ酸配列を含み、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、

〔28〕 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列の全部又はその一部を含み、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、

〔29〕 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、または置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、

〔30〕 前記〔20〕～〔25〕いずれか記載のDNAを含んでなる組換えDNA、

〔31〕 微生物、動物若しくは動物細胞、又は植物若しくは植物細胞において、コードされたポリペプチドを発現することができる前記〔30〕記載の組換えDNA、

〔32〕 前記〔30〕又は〔31〕記載の組換えDNAを挿入されてなる、微

生物、動物細胞又は植物細胞を宿主細胞とする発現ベクター、

〔33〕 発現ベクターがプラスミド pAT28、pAT29、または pAT30 である前記〔32〕記載の発現ベクター、

〔34〕 前記〔32〕又は〔33〕記載の発現ベクターにより形質転換される形質転換体、

〔35〕 形質転換体が大腸菌である前記〔34〕記載の形質転換体、

〔36〕 大腸菌が *E. coli* JM109 (pAT28)、*E. coli* JM109 (pAT29)、又は *E. coli* JM109 (pAT30) である前記〔35〕記載の形質転換体、

〔37〕 前記〔34〕～〔36〕いずれか記載の形質転換体を培養もしくは育種することによって、培養に用いた培養液又は該形質転換体より立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法、

〔38〕 トランスアミナーゼとして、前記〔37〕記載の製造方法により得られる立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを用いる前記〔1〕～〔19〕いずれか記載の製造方法、

〔39〕 配列番号：2に記載した塩基配列を有するDNAの全部あるいは一部分と、又は該DNAの相補鎖の全部あるいは一部分と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、並びに

〔40〕 前記〔20〕～〔25〕いずれか記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、プローブ又はプライマーとして用いることができるオリゴヌクレオチド、に関するものである。

図面の簡単な説明

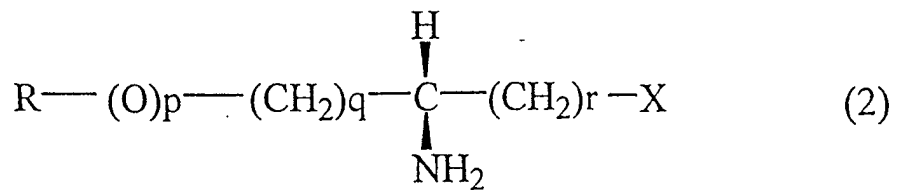
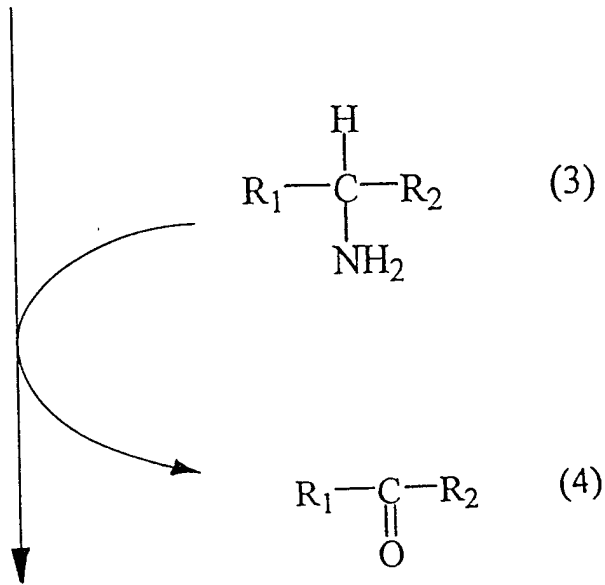
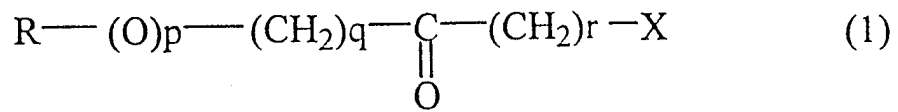
第1図は、本酵素の至適pHを示す図である。

第2図は、本酵素のpH安定性を示す図である。

第3図は、本酵素遺伝子を持つプラスミドの作製方法と簡単な制限酵素地図を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下に、さらに詳しく本発明を説明する。まず、本発明における反応スキームを以下に示す。



本発明者らは、ケトン類を基質にして(R)体特異的に(R)-アミノ化合物を生成する能力を有する菌を国内土壌より分離すべく、スクリーニングを重ねたところ、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属の細菌に本反応を触媒する強い活性を認めた。その中で代表的なアルスロバクター・スピーシーズ [*Arthrobacter* sp. KNK168と命名され、平成7年9月8日(原寄託日)より受託番号:FERM BP-5228として、通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(あて名:日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号(郵便番号305-0046))に寄託されている]について、その菌学的な性質を以下に示す。

細胞の形態	: 桿菌 (コリネ型)
グラム染色	: 陽性
胞子形成	: 無し
運動性	: 無し
コロニーの形態	: 丸い、規則的な、完全な、黄色、スムーズな、光沢のある、やや半透明な、凸面の、直径2mmのコロニー (Bennett の寒天培地)
生育 (30℃)	: +
(37℃)	: -
カタラーゼ	: +
オキシダーゼ	: -
OFテスト (グルコース)	: - (酸化的)
細胞壁	: ミコール酸無し ジアミノ酸はリジン
脂肪酸分析	: 殆どが3つに枝分かれしたイソ、及びアンテイス酸

本菌が生産するトランスアミナーゼは、後に詳述するように、例えばアミノ基

供与体としては、(R)-1-フェニルエチルアミンのような(R)体のアミンを利用し、アミノ基受容体として1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノンを用いた場合、生成物は光学活性な(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンを生成する点で、アミノ基供与体として(S)体アミンを利用し、かつ生成物が光学活性な(S)-アミノ化合物である、中道ら(Appl. Microbiol. Biotechnol., 33, 634-640 (1990)) が用いているブレヴィバクテリウム・リーネンス(*Brevibacterium linens*) IFO12141の酵素や、スターリングら(特開平3-103192号公報)が利用した ω -アミノ酸トランスアミナーゼとは明らかに異なる。

さらに、本発明に用いられるアルスロバクターのトランスアミナーゼは、他の多くの点で上記のブレヴィバクテリウムの酵素と異なっている。例えば、塩化アンモニウム等の無機のアンモニウム塩やグルタミン酸やアスパラギン酸等のL-アミノ酸((S)アミンである。)をアミノ基供与体として用いることができない点等で違っている(表1)。

表1

アミノ基供与体	本発明のトランスアミナーゼ	中道らの酵素
無機アンモニウム塩	-	+
L-アミノ酸	-	+

また、本発明に用いられるアルスロバクターのトランスアミナーゼをスターリングら(特開平3-103192号公報)が用いている ω -アミノ酸トランスアミナーゼと比較すると、上記の基質特異性についての明確な相違に加えて、アルスロバクターのトランスアミナーゼは、 β -アラニンや4-アミノ酪酸等の ω -

アミノ酸、またn-ブチルアミン、プトレッシンのようなω-アミン又はDL-3-アミノ酪酸等には作用しない点、そしてヒドロキシルアミンやフェニルヒドラジン等の反応阻害剤による影響が微弱である点等が違っている。

また、本発明者らの酵素と類似する他の酵素としては、ピルビン酸の存在下でベンジルアミンに強く作用してL-アラニンとベンズアルデヒドを生成するベンジルアミントランスアミナーゼが岡田ら（特開平6-178685号公報）によって開示されているが、この酵素によるトランスアミナーゼ反応の生成物の光学活性が、(S)体であるL-アラニンである点で上記のプレビバクテリウムの酵素やω-アミノ酸トランスアミナーゼと同種の光学選択性を示す酵素であり、本発明に使用されるアルスロバクターのトランスアミナーゼとは全く異なる酵素であるということができる。

さらに、これらの酵素を比較した場合、フェニルヒドラジン、D-ペニシラミン、そしてp-クロロメルクリ安息香酸等の反応阻害剤による影響に差があるように思われる。

以下にω-アミノ酸トランスアミナーゼとしてよく調べられているシュウドモナス sp. F-1由来のω-アミノ酸トランスアミナーゼ（アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー（Agric. Biol. Chem.）, 42巻, 2363-2367頁（1978年）、アグリカルチュラル・バイオロジカル・ケミストリー（Agric. Biol. Chem.）, 43巻, 1043-1048頁（1979年）、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（J. Biol. Chem.）, 258巻, 2260-2265頁（1983年））及び岡田らのベンジルアミントランスアミナーゼ（特開平6-178685号公報）との違いを表2にまとめて示す。本発明のトランスアミナーゼ反応は精製酵素で、他の二酵素についてはそれぞれの文献及び公開特許公報に記載されている精製酵素によるデータで示した。アミノ基受容体はいずれもピルビン酸を用いている。

表 2

	本発明の トランスアミナーゼ	ω -アミノ酸 トランスアミナーゼ	岡田らの トランスアミナーゼ
基質特異性			
β -アラニン	0 *	100 *	0 *
4-アミノ酪酸	0	40	
DL-3-アミノ酪酸	0	96	
n-ブチルアミン	0	60	0
ベンジルアミン	0.8	45	100
プトレッシン	0	55	0
β -フェニルアミン	0	54	9
アミノ基供与体 L-アラニン	-	+	+
阻害剤 (各 1 mM) (無添加)	100 *	100 *	100 *
ヒドロキシルアミン	17	0	30 (0.1mM)
フェニルヒドラジン	82	6	27
D-ベンシラミン	93	65	0
p-クロロメルクリ安息香酸	53	100	9 (0.1mM)
CuSO ₄	44		5 (0.5mM)
ガバクリン	24	0	

注) * : 数値は相対活性 (%) で示されている。

また、代表的な ω -アミノトランスフェラーゼの基質に対する、本発明に用いられるトランスアミナーゼ (菌体内酵素) の活性を表 3 に示す。 ω -アミノ酸、 ω -アミンをアミノ基供与体とした場合は、 ω -アミノトランスフェラーゼ活性は極めて小さく、また ω -アミノ酸-ピルビン酸アミノトランスフェラーゼの代表的基質である β -アラニンには作用しない。(R)-1-フェニルエチルアミンに対して特異的に高い活性を示す。従って、 ω -アミノトランスアミナーゼとは、基質特異性が全く異なる。

表 3

アミノ基供与体	アミノ基受容体	相対活性 (%)
β -アラニン	ピルビン酸	0
4-アミノ酪酸	2-ケトグルタル酸	0
2,5-ジアミノバレート (α , ω -アミノ酸)	2-ケトグルタル酸	2
DL-オルニチン	2-ケトグルタル酸	0
DL-リジン	2-ケトグルタル酸	0
プトレッシン (α , ω -ジアミン)	2-ケトグルタル酸	0
α -2,4-ジアミノ酪酸	ピルビン酸	0
タウリン	2-ケトグルタル酸	0
DL-アスパラギン	2-ケトグルタル酸	0
DL-グルタミン	2-ケトグルタル酸	0
(R)-1-フェニルエチルアミン	ピルビン酸	100 *

注) * : 対照

本発明に使用されるアミノ基転移反応を行う際には、菌の培養時に誘導物質を添加すれば酵素発現量が上昇する。かかる誘導物質としては (RS) - 1 - メチルプロピルアミン、(RS) - 1 - フェニルエチルアミン、(RS) - 1 - メチルブチルアミン、(RS) - 3 - アミノ - 2, 2 - ジメチルブタン、(RS) - 2 - アミノ - 1 - ブタノール、及び (R) 又は (RS) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) アミノプロパン等のアミン類からなる群より選択される一種以上が用いられる。

本発明のDNAは、立体選択的にアミノ基を転移させる活性（「立体選択的なトランスアミナーゼ活性」と略記する。）を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有してなる。かかるDNAとしては、例えば、1) 配列表の配列番号 : 1 に記載されたアミノ酸配列の全部又はその一部をコードするDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、2) 配列表の配列番号 : 2 に記載された塩基配列の全部又はその一部を

含むDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、3) 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、または置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA、及び4) 配列表の配列番号：2に記載された塩基配列において、1個以上の塩基が欠失、付加、挿入、または置換された塩基配列からなるDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。

本発明のDNAは、以下に記載する方法でクローニングされ得る。

トランスアミナーゼ遺伝子のクローニング方法としては、当該活性を指標にする方法や当該酵素のアミノ酸配列を利用する方法等が利用できる。本発明ではアミノ酸配列を利用する方法について記述するが、同方法に限定されないことはいうまでもない。以下、まず、トランスアミナーゼの単離精製について説明し、次に、当該トランスアミナーゼ遺伝子をクローニングする方法について説明する。さらに、同遺伝子の発現（トランスアミナーゼの生産）についても説明する。

(トランスアミナーゼの単離精製)

用いる菌株としては、ケトン類を基質にして立体選択的に一般式(2)で表される様な光学活性アミノ化合物に変換する立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを生産する菌株であればどのような菌株であってもよい。例えば、アルスロバクター属に属する菌株由来のものが例示される。その中で代表的な菌株アルスロバクター・スピーシーズKNK168 (FERM BP-5228)の生産するトランスアミナーゼの単離精製について以下に示す。

KNK168の培養には、同菌株が生育しかつトランスアミナーゼを生産する培養方法であればどのような方法でもよいが、好適には次に示す培養方法を用いる。2リットル容ミニジャーを用い、1.5リットルのJ培地(5g/l KH₂PO₄、5g/l K₂HPO₄、1g/l NaCl、1g/l MgS

$O_4 \cdot 7H_2O$ 、 $0.005g/l$ $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $0.001g/l$
 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $0.001g/l$ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、 0.00
 $05g/l$ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ (pH7.5)、 $40g/l$ グリセリン、 $3g$
 $/l$ 粉末酵母エキス、 $20g/l$ プロエキス (播州調味料製)、pH7.5
に調整) に $30ml$ の同培地で一晚培養した前培養液を植菌し、 $30^\circ C$ 、 0.5
 vvm 、 $450rpm$ で 43 時間、pHを7.5に調整しながら培養する。なお
、培養開始後、 14 時間後に最終濃度 $4g/l$ となるように除菌フィルターでろ
過した (RS) - 1 - メチルプロピルアミンを添加して培養する。

培養液から遠心分離等の方法によって菌体を集め、好適な緩衝液、例えば 20
 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH6.8)、 0.01% 2-メルカプトエタノー
ルに懸濁する。ダイノミル (Dynomill、スイス) 等の処理によって菌体を破碎し
、遠心分離によって上清を得る。これに、硫酸プロタミンを $50mg/ml$ とな
るように添加して核酸を除き、硫酸等の塩析によってトランスアミナーゼを沈殿
させる。好適な例として、硫酸 30% から 60% 飽和の間で塩析される画分が集
められる。これを前記緩衝液に溶解させ、同緩衝液に対して透析した後、陰イオ
ン交換樹脂によって更に精製される。好適な例として、透析サンプルを 20% (
 v/v) グリセリン、 $0.3M$ $NaCl$ 、 $20\mu M$ ピリドキサルリン酸と
なるように添加した同緩衝液組成に調整後、この液で平衡化したDEAE-セフ
ァロース、ファーストフロー (ファルマシアLKB) カラムに供し、前記緩衝液
で該カラムを洗浄後、 $0.3-0.5M$ $NaCl$ 直線濃度勾配によって溶出さ
せる。活性画分を集め疎水クロマトグラフィーを行うことによって更に精製され
うる。好適には、フェニル・セファロース (ファルマシアLKB) が用いられる
。活性画分を透析後、 $0.2M$ になるように硫酸を添加し、 $0.3M$ $NaCl$
のかわりに $0.2M$ 硫酸を含む前記緩衝液で平衡化したフェニルセファロース
カラムに供し、 0.2 から $0M$ の硫酸の直線濃度勾配によって溶出する。この活
性画分の硫酸濃度を $0.6M$ に調整した後、 $0.2M$ 硫酸のかわりに $0.6M$

硫酸を含む緩衝液で平衡化したブチルセファロース（ファルマシア LKB）カラムに供する。この活性画分を集め、限外ろ過等の方法によって濃縮することにより、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動でほぼ単一まで精製されたトランスアミナーゼ標品を得ることができる。

（アミノ酸配列分析）

次に、精製されたトランスアミナーゼについて、その部分アミノ酸配列に関する情報を得る。部分アミノ酸配列を決定は、エドマン分解法によって行うことができ、気相プロテインシーケンサー（アプライド・バイオシステム社、470A型）等を利用することによってアミノ酸配列を決定できる。精製されたトランスアミナーゼを用いて直接アミノ酸配列決定を行うことによって、N末端アミノ酸配列を決定できる。あるいは、特異性の高いタンパク質加水分解酵素、例えば牛脾臓由来N-トシル-L-フェニルアラニルクロロメチルケトン（TPCK）-トリプシン、Staphyrococcus aureus V8 strain 由来V8プロテアーゼ等、を作用させて限定加水分解を行い、得られるペプチド断片を逆相系HPLC等を用いて分離精製した後、アミノ酸配列を決定し、内部アミノ酸配列を得ることができる。

こうして得られる部分アミノ酸配列の情報をもとにトランスアミナーゼのクローニングを行い得る。

（トランスアミナーゼ遺伝子のクローニング）

トランスアミナーゼの部分アミノ酸配列をもとに同遺伝子のクローニングを行う方法としては、一般的に用いられるPCR法やハイブリダイゼーション法、またそれらの組みあわせ等が用いられうる。

a) 染色体DNAライブラリーの作成

染色体DNAライブラリーの作成はプラスミドベクター、やλファージベクターあるいはコスミドベクターを用いる方法がManiatis等によって示されている（Molecular Cloning, T. Maniatis ら、Cold Spring Harbor Press）。KNK 1

68の染色体DNAはCurrent Protocol in Molecular Biology (F. Ausubel 等 Willy Interscience)に記載の方法等によって調製することができる。得られた染色体DNAを種々の制限酵素、たとえばSau3AIやTthHB8I、によって部分消化を行い、アガロースゲル電気泳動やショ糖密度勾配遠心等の方法によって、ベクターに組み込むために適切な大きさの染色体DNA断片を精製する。ベクターの挿入部位は染色体DNAの調製に使用される制限酵素によって、適切に選ぶ必要がある。例えば、染色体DNAをSau3AIで切断して調製した場合には、BamHIが好適である。λファージベクターではおよそ8 kbから20数kbのDNA断片を挿入することが可能であり、コスミドベクターではさらに大きなDNA断片を挿入することができる。プラスミドを用いたライブラリーでは大きなDNA断片を挿入することが、後述するスクリーニングを行う上で有利であるが、どのようなサイズの染色体DNA断片を挿入してもよい。プラスミドベクターとしてはpUC18, pUC19, pUC119, pTV118Nなどが好適に使用できるが、特に限定されない。

染色体DNAライブラリーとしては上記のいずれを用いてもよいが、以下、プラスミドを用いた場合について詳述する。

b) 形質転換

上記の方法で作製した組み換えプラスミドを宿主に導入して宿主を形質転換するが、宿主として大腸菌を使用する場合、宿主大腸菌としては形質転換能を有するものであれば野生株、変異株のいずれも使用できる。形質転換方法は通常もちいられる方法、例えばT. Maniatis等の方法 (Molecular Cloning, T. Maniatis 等、Cold Spring Harbor Press) によって行うことができる。

形質転換株の選別は、例えばpUC19の場合、アンピシリンを含むプレート培地上で生育するコロニーとして選別される。さらに、染色体DNAを挿入された形質転換株は5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド (X-Gal) およびイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG) を含むプレート上で、アンピシリン耐性を示しかつ白色を呈するコロニ

ーを選別することによって得られる。

このようにしてプラスミドベクターを用いた染色体DNAライブラリーが作製され得る。

c) プローブの作製

ハイブリダイゼーションやPCRに用いるためのプローブやプライマーとして使用されるDNAは高い特異性が要求される。トランスアミナーゼの部分アミノ酸配列からプローブやプライマーを作製する場合、当該アミノ酸配列に対応する一本鎖DNAを作製することが一般的である。各アミノ酸に対応するコドンはメチオニンやトリプトファンのように1種類のものからロイシンのように6種類のものまでである。プローブやプライマーの特異性を高めるためには、それらの鎖長を長くする必要があり、また当該アミノ酸配列に対応する塩基配列の種類が少ないことも必要である。好適な例としては、15ヌクレオチド以上の鎖長からなり、100~200種類以下の一本鎖DNAの混合物が望ましいが、特異性が得られればこれらに限るものではない。また、複数の塩基が対応する部位にイノシンを導入することによって、プローブやプライマーとして使用する場合もある。これらのDNAはDNA合成機等を用いて合成することができる。

トランスアミナーゼのクローニングをコロニーハイブリダイゼーションによって行う場合には、合成したプローブの5'末端を放射能標識や蛍光標識等を行う。放射能標識の例としては $[\gamma-^{32}\text{P}]-\text{ATP}$ とMEGALABEL™(宝酒造(株))を用いることにより、高比活性のプローブを調製することができる。

部分アミノ酸配列を基にN末端側と内部の2本のプライマーを前述したように合成し、染色体DNAをテンプレートにしてPCR反応を行うことにより、トランスアミナーゼの遺伝子の一部を増幅することができる。こうして増幅した遺伝子を放射能標識や蛍光標識等をおこないプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションに供することもできる。放射能標識の例としては、 $[\alpha-^{32}\text{P}]-\text{dC}$

TPとRandom Primer DNA Labeling kit ver 2 (宝酒造(株))を用いることにより、高比活性のプローブを調製することができる。なお当該PCR増幅DNAがトランスアミナーゼ遺伝子の一部であることは、当該DNAを後述するDNA塩基配列の決定法によって塩基配列を決定し、前記塩基配列から推定されるアミノ酸配列と先に得られている部分アミノ酸配列とを比較することによって確認できる。

d) コロニーハイブリダイゼーションによるトランスアミナーゼ遺伝子のクローニング

プラスミドライブラリーとプローブをもちいてコロニーハイブリダイゼーションを行い、トランスアミナーゼ遺伝子のクローニングを行う。コロニーハイブリダイゼーションはT.Maniatis 等の方法 (Molecular Cloning, T.Maniatis 等、Cold Spring Harbor Laboratory Press) が利用できる。

放射能標識や蛍光標識された部分アミノ酸配列に対応する合成DNAプローブを利用する場合は、ハイブリダイゼーションの温度や洗浄の際の温度、塩濃度を当該DNAの T_m 値を考慮してそれぞれのプローブに対して設定する必要がある。

PCRで増幅したDNA断片をプローブとして利用する場合は、比較的鎖長が長いことから、ハイブリダイゼーションや洗浄の際の温度は60～65℃が用いられる場合が多い。

このようにしてスクリーニングされた陽性クローンについてプラスミドDNAを抽出し、塩基配列の決定を行い、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列と内部アミノ酸配列とを比較することによって目的クローンであるかどうか決定することができる。

こうしてクローニングされたトランスアミナーゼ遺伝子からは1種類のポリペプチドが翻訳されるが、各アミノ酸に対応するコドンは1～6種類あることから、当該ポリペプチドのアミノ酸配列に対応する遺伝子は多種類存在する。また、

当該ポリペプチドのアミノ酸配列に、アミノ酸置換や欠失、挿入または付加を導入した立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子も多種類存在する。更に、当該遺伝子をクローニングした生物種以外の生物が有する立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする遺伝子は、当該遺伝子とはアミノ酸配列が全く同一ではないが、アミノ酸配列や塩基配列においてホモロジーが存在する。

塩基配列のホモロジーを実験的に検出する方法としてハイブリダイゼーション法が利用できるが、当該トランスアミナーゼ遺伝子の全てまたは一部分とハイブリダイズする遺伝子として、上記トランスアミナーゼ遺伝子は含まれる。従って、当該トランスアミナーゼ遺伝子の全てまたは一部分とハイブリダイズする遺伝子は、本発明に包含されると言える。

具体的には、配列表の配列番号：2に示されるDNAの全部あるいは一部分と、又はかかるDNAの相補鎖の全部あるいは一部分と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAが挙げられる。

また、本発明のオリゴヌクレオチドは、本発明のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするオリゴヌクレオチドであって、プローブ又はプライマーとして用いることができる。

ハイブリダイゼーションは、T. Maniatisらの方法(Molecular Cloning, T. Maniatisら, Cold Spring Harbor Laboratory Press)等が利用でき、その特異性はハイブリダイズする温度、洗浄温度、洗浄液の塩濃度等によって決定される、プローブとして用いる当該トランスアミナーゼ遺伝子の長さや、対象となるDNAとの組合せによってハイブリダイゼーションの条件を適宜選べば良い。ハイブリダイズはストリンジェントな条件で行われ、具体的には、温度と洗浄温度は30℃以上が用いられ、洗浄液の塩濃度は2×SSCまたは2×SSPE以下の塩濃

度の洗浄液が用いられる。

e) DNA塩基配列の決定

DNA塩基配列の決定は、Sanger法あるいはMaxam-Gilbert法 (Molecular Cloning, T. Maniatis 等、Cold Spring Harbor Laboratory Press) を用いて行われ得る。さらに、(株)パーキンエルマージャパンのDNA Sequencing kit (Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction) を用い、ABI373A DNAシーケンサーによって行うこともできる。

決定された塩基配列を解析し、該塩基配列から推定されるアミノ酸配列と先に得られている部分アミノ酸配列とを比較することによりトランスアミナーゼ遺伝子の構造を明らかにすることができる。

(トランスアミナーゼの遺伝子発現)

トランスアミナーゼの生産を行うためには宿主として微生物、動物および動物細胞、植物および植物細胞等が利用され得る。それぞれの宿主に対して好適な発現ベクターに、トランスアミナーゼ遺伝子を挿入し、当該宿主に形質転換を行う。得られる形質転換株を培養することにより、トランスアミナーゼを生産することができる。

好適な例として、大腸菌を宿主として用いることができる。発現ベクターとしてはラクトースオペロンのプロモーターを利用した発現ベクター、例えばpUCNT (WO 94/03613)、 λ ファージのP_Lプロモーターを利用した発現ベクター、例えばpPL-1 λ (ファルマシア LKB)、T_acプロモーターを利用した発現ベクター、例えばpKK223-3 (ファルマシア LKB) を利用することができる。

挿入するトランスアミナーゼ遺伝子は、当該酵素の翻訳開始コドンから終止コドンまでを含む断片が用いられる。好適には当該遺伝子上流、下流それぞれに余分のDNAを含まないことが望ましいが、特にこれによって制限を受けない。また遺伝子によっては翻訳開始コドンがATGに代えてGTGやTTG等が使用

されている場合が在り、このような場合には大腸菌での発現のためには開始コドンを変換することがより好適である。

以上をまとめると、本発明の立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドとしては、例えば上記のアルスロバクター属に属する微生物の培養により得ることができる。かかるポリペプチドとしては、例えば、1) 配列表の配列番号：3、配列番号：4、又は配列番号：6に記載された部分アミノ酸配列を含み、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、2) 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列の全部又はその一部を含み、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド、及び、3) 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、または置換されたアミノ酸からなるポリペプチドであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドが挙げられる。

本発明の組換えDNAは、上記の本発明のDNAを含んでなる。かかる組換えDNAとしては、好ましくは、微生物、動物若しくは動物細胞、又は植物若しくは植物細胞において、コードされたポリペプチドを発現することができる発現ベクターである。例えば、一例としてpUCNTに立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有するDNAを挿入した、上記発現ベクターがプラスミドpAT28、pAT29、またはpAT30である組換えDNAが挙げられる。かかるプラスミドは、実施例に記載の方法で得ることができる。

本発明の形質転換体は上記の本発明の発現ベクターにより形質転換されてなる。かかる形質転換体としては、例えば、大腸菌〔*Escherichia coli* (以下、*E. coli*)〕JM109やHB101を形質転換した形質転換体が挙げられる。形質転換体として用いられる大腸菌としては、具体的には、*E. coli* JM109 (pAT28)、*E. coli* JM109 (pAT29)、又は*E. coli* JM109 (pAT30)が挙げられる。

上記の本発明の発現ベクターで公知の方法により形質転換し、形質転換体を得ることができる。

本発明の立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法は、上記の本発明の形質転換体を培養もしくは育種することによって、培養に用いた培養液又は該形質転換体より立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする。培地組成、培地のpH、培養温度、IPTGの使用の有無と添加の時間、培養時間等について最適条件を決定することにより、効率良くトランスアミナーゼを生産し得る。本発明のポリペプチドの製造方法により得られるトランスアミナーゼは、本発明の光学活性アミノ化合物の製造方法に好適に用いることができる。

形質転換体の培養物から立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを精製するには、通常の方法が用いられる。形質転換体が大腸菌の場合のようにポリペプチドが菌体内蓄積する場合は、培養終了後遠心分離等によって形質転換体を集め、これを超音波処理等によって破碎した後、遠心分離等によって無細胞抽出液を得る。これを、塩析や、イオン交換、ゲルろ過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィー等の一般的なタンパク質精製法により精製することができる。用いる宿主-ベクター系によっては発現産物が形質転換体外に分泌される場合があるが、この場合は培養上清から同様に精製すればよい。

また、宿主が大腸菌の場合、発現産物が不溶性の封入体として形成される場合がある。この場合、培養終了後遠心分離によって菌体を集め、これを超音波処理などによって破碎した後、遠心分離等を行うことにより封入体を含む不溶性画分を集める。封入体を洗浄した後、通常用いられるタンパク質可溶化剤、例えば尿素や塩酸グアニジン等で可溶化し、必要に応じてこれをイオン交換、ゲルろ過、疎水、アフィニティーなどの各種クロマトグラフィーを行うことにより精製した後、透析法あるいは希釈法などを用いたリフォールディング操作を行うことによ

って活性を有するトランスアミナーゼを得ることができる。

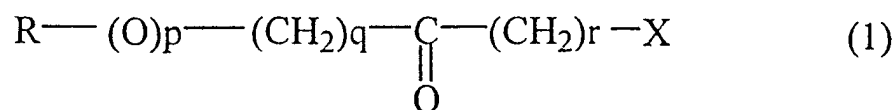
本発明に用いられるトランスアミナーゼは、各種の態様で使用することができる。すなわち、微生物の培養物、分離した菌体、菌体処理物をはじめ、無細胞抽出液、部分精製酵素、精製酵素等を用いることができ、更にはこれらの菌体の固定化物、菌体処理物の固定化物、酵素タンパク質の固定化用担体（例えば、陰イオン交換樹脂）への固定化物等が使用できる。なお、固定化は、常法（例えば特開昭63-185382号公報）に従って行うことができる。

固定化に使用される支持体としては、デュオライト (Duolite) A 5 6 8 又は D S 1 7 1 8 6 (ローム・アンド・ハース社：登録商標) 等のフェノールホルムアルデヒド陰イオン交換樹脂、アンバーライト (Amberlite) I R A 9 3 5、I R A 9 4 5、I R A 9 0 1 (ローム・アンド・ハース社：登録商標)、レワタイト (Lewatit) O C 1 0 3 7 (バイエル社：登録商標)、ダイアイオン (Diaion) E X - 0 5 (三菱化学：登録商標) 等のポリスチレン樹脂のような各種アミンやアンモニウム塩あるいはジエタノールアミン型の官能基を持つ各種の陰イオン交換樹脂が適している。その他 D E A E - セルロース等の支持体も使用することができる。

更に、酵素の吸着をより強固かつ安定にするため、通常、架橋剤を用いるが、好適な例として、グルタルアルデヒドを挙げることができる。使用する酵素は、精製酵素だけではなく、部分精製酵素、菌体破碎液、無細胞抽出液等、種々の精製度のものが使用できる。

固定化酵素の調製は支持体に酵素を吸着後、架橋処理をする等の通常の調製法が使用できる。

本発明に使用されるアミノ基受容体としては、一般式(1)で示されるケトン化合物が挙げられる。



式中、pは0または1を示し、qは0～8の整数を示し、rは0～4の整数を示し、Rは炭素数6～14の置換または無置換のアリール基、炭素数4～12のヘテロアリール基、カルボシキル基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、メチル基、または水素原子のいずれかを示し、Xは水酸基、カルボシキル基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、または水素原子のいずれかを示す。

置換アリール基としては、例えばハロゲン原子、炭素数1～6のアルキル基、水酸基、メトキシ基、モノフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、及びトリフルオロメチル基からなる群より選択される一種以上の置換基により一ヶ所以上置換されたアリール基が挙げられる。具体的には、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2,4-ジメトキシフェニル基、3,4-ジメトキシフェニル基、2-トリフルオロメチルフェニル基、3-トリフルオロメチルフェニル基、及び4-トリフルオロメチルフェニル基からなる群より選択される基が挙げられる。

ヘテロアリール基としては、例えばピリジル基、ピラジニル基、チエニル基、フリル基、及びチアゾリル基からなる群より選択される基が挙げられる。

前記一般式(1)で示されるケトン化合物の中では、特にpが0、qが1、rが1、Xが水素原子の1-アリアル-2-プロパノンが好ましく、更に詳しくは、前記1-アリアル-2-プロパノン中のアリール基がフェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2,4-ジメトキシフェニル基、3,4-ジメトキシフェニル基、2-トリフルオロメチルフェニル基、3-トリフルオロメチルフェニル基、4-トリフルオロメチルフェ

ニル基である化合物が好ましい。

また、Rがメチル基、pが1、qが1、rが1、Xが水素原子である、1-メトキシ-2-プロパノンが好ましい。更に、pが0、qが1、rが0、Rが水素原子でありXがカルボキシル基のピルビン酸やそのアルキルエステル等も好ましい基質となる。

本発明に使用されるアミノ基供与体は第一アミンであり、例えば、一般式(3)で示される非キラルもしくはラセミ体又は光学活性体アミノ化合物類が挙げられる。



式中、R₁、R₂はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数1~14の置換若しくは無置換のアルキル基、炭素数6~14の置換若しくは無置換のアリール基、炭素数1~14の置換若しくは無置換のアラルキル基、カルボキシル基、又は炭素数1~10のアルコキシカルボニル基を示し、R₁とR₂は分子内で結合して環を形成してもよい。

更に詳しくは、R₁が炭素数1~10のアルキル基、フェニル基、ナフチル基のいずれかであり、R₂がメチル基、エチル基、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、カルボキシル基、炭素数1~10のアルコキシカルボニル基、カルボキシメチル基のいずれかである第一アミン等が好ましい。

本発明で用いられる第一アミンの具体例としては、(R)-1-フェニルエチルアミン、(R)-1-ナフチルエチルアミン、(R)-1-メチルプロピルアミン、(R)-1-メチルヘキシルアミン、(R)-2-アミノ-1-プロパノール、(R)-1-メチルブチルアミン、(R)-1-フェニルメチルアミン、

(R) - 1 - アミノ - 1 - フェニルエタノール、(R) - 2 - アミノ - 2 - フェニルエタノール、(R) - 3 - アミノヘプタン、(R) - 1 - アミノ - 3 - フェニルプロパン、(R) - 2 - アミノ - 4 - フェニルブタン、(R) - 2 - アミノ - 3 - フェニルプロパノール、(R) - 1 - メチルヘプチルアミン、ベンジルアミン、(S) - 2 - フェニルグリシノール、(R) - 3 - アミノフェニルブタン、L - フェニルアラニノール、(R) - 2 - アミノ - 1 - メトキシプロパン、D - アラニン、アルキル基の炭素数が 1 ~ 9 の、D - アラニンのアルキルエステル（例えば、D - アラニンメチルエステル、D - アラニンエチルエステル等）、(R) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - アミノプロパン、又は (R) - 1 - フェニル - 2 - アミノプロパン等が挙げられる。また、これら化合物のラセミ体も第一アミンとして挙げられる。

本発明の製造方法は、上記のケトン化合物に、上記第一アミンの存在下、立体選択的にアミノ基転移を行わせる活性を有する、上記のトランスアミナーゼを作用させることにより所望の光学活性アミノ化合物を得るというものである。

かかる酵素タンパク質をケトン化合物に作用させる方法としては、例えば、該酵素タンパク質を生産する微生物の培養物、分離した菌体、菌体処理物、又は固定化菌体と、ケトン化合物及び第一アミンとを接触させる方法や、該酵素タンパク質を生産する微生物の無細胞抽出物、部分精製酵素タンパク質、精製酵素タンパク質、又は固定化酵素タンパク質と、ケトン化合物及び第一アミンとを接触させる方法等が挙げられる。

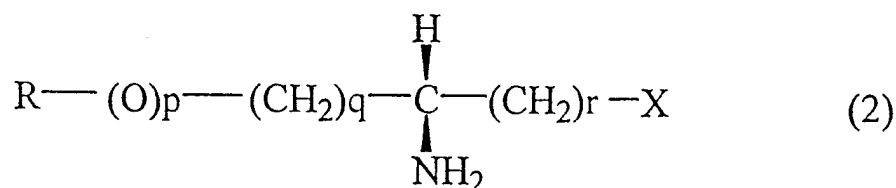
反応に用いる基質の濃度は、アミノ基受容体が 0.1 ~ 10%、好ましくは 3 ~ 5% であり、アミノ基供与体としては、キラルアミンの場合は主として (R) 体を、アミノ基受容体に対して 80 ~ 150 モル% 程度の濃度で用いることが好ましい。アミノ基供与体としてラセミ体のアミノ化合物を使用することもできる。ただし、使用濃度は光学活性体の場合の 2 倍の濃度を要する。

トランスアミナーゼを作用させる際の pH は、pH 5.0 ~ 12.0 が好まし

く、より好ましくはpH 7.0～10.0である。また、反応時の温度は、25～40℃が好ましく、より好ましくは30～35℃である。

さらに、トランスアミナーゼを作用させる際に、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）、トリトンX-100、臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）等の界面活性剤やリノール酸、オレイン酸等の脂肪酸を反応促進物質として添加することにより、反応生成物の収率が向上することがある。このときの界面活性剤や脂肪酸の添加量は、ケトン化合物、第一アミン、トランスアミナーゼ等が含有される反応液の0.1～10重量%となる量が好ましい。

本発明の製造方法によって製造されるアミノ化合物は、一般式（2）で示される立体配置を持つ光学活性アミノ化合物である。



式中、p、q、r、R、及びXは、それぞれ一般式（1）におけるp、q、r、R、及びXと同意義を示す。

具体的には、（R）-1-フェニル-2-アミノプロパン、（R）-1-フェニル-3-アミノブタン、（R）-1-（3,4-ジメトキシフェニル）-2-アミノプロパン、（R）-3-（トリフルオロメチルフェニル）-2-アミノプロパン、（R）-3-（p-メトキシフェニル）-2-アミノプロパン、（R）-4-（p-メトキシフェニル）-2-アミノブタン、（R）-4-（3',4'-メチレンジオキシフェニル）-2-アミノブタン、（R）-4-（p-ヒドロキシフェニル）-2-アミノブタン、（R）-2-アミノ-1-メトキシプロパン等が挙げられる。

本発明の光学活性アミノ化合物の製造方法によれば、例えば、アルスロバクタ

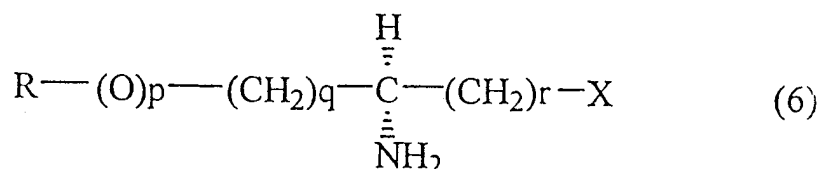
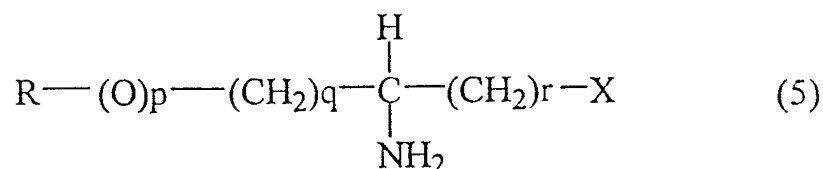
ー・スピーシーズKNK168 (FERM BP-5228) を用い、1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノンをアミノ基受容体、(R)-1-フェニルエチルアミンをアミノ基供与体として、それぞれ3%濃度で20時間程度の反応をさせた場合、アミノ基転移反応によって、75%以上の1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノンを99%以上の光学純度の(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンに転換させることができる。

反応生成物として得られる光学活性アミノ化合物の定量は、高速液体クロマトグラフィーによって行うことが可能である。例えば、反応液を逆相カラム(コスモシル5 C₁₈-AR、ナカライテスク等)を用い、25%アセトニトリル等を移動相として分離し、210nmの吸収を、対照と比較することによって定量分析を行うことができる。また光学純度を測定する方法としては、いくつかの方法があるが、例えば、生成した光学活性アミノ化合物をN-カルボキシー-L-ロイシンアンヒドライド等と結合させてジアステレオマーを形成させ、これを上記の高速液体クロマトグラフィーの方法で分離、定量することによって、分析を行うことができる。

反応後に目的とする光学活性アミノ化合物を分離する方法としては、有機溶媒による抽出と蒸留を組み合わせた通常の方法によって行うことができる。例えば、抽出溶媒としては、酢酸エチルやトルエン等が使用可能で、反応液をまず酸性にして抽出を行うことにより、ケトン類を除き、その後アルカリ性にして抽出することにより目的化合物を含むアミン類を分離する。そしてこの抽出画分を更に蒸留することによって目的の光学活性アミノ化合物を単離することができる。

本発明に用いられるトランスアミナーゼは立体選択的にアミノ基転移反応を行う活性を有するため、一般式(4)で示されるケトン化合物(アミノ基受容体)の存在下に、一般式(5)で示されるラセミ体のアミノ化合物に該酵素タンパク質を作用させると、一方の立体のアミノ化合物のみが選択的にケトン化合物に変

換され、その対掌体は変化を受けずにアミノ化合物として回収することができる。従って、本発明に用いられるトランスアミナーゼを用いて、ラセミ体のアミノ化合物から容易に一般式(6)で示される光学活性アミノ化合物を製造することが可能である。



(式中、R、p、q、r、X、R₁、R₂は一般式(1)、一般式(3)におけるR、p、q、r、X、R₁、R₂と同じである。)

例えば、アルスロバクター・スピーシーズKNK168 (FERM BP-5228)を用い、ラセミ体の1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンや2-アミノ-1-メトキシプロパンをアミノ基供与体とし、ピルビン酸をアミノ基受容体として反応させた場合、アミノ基転移により(R)体のアミノ化合物がケトン体に転換し、(S)体のアミノ化合物が約50%の収率で得られ、高い光学純度まで濃縮された状態で取得することができる。

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例によりなんら限定されるものではない。

実施例 1

国内各地より採取した土壌サンプル各 2 g を 5 ml の生理食塩水に懸濁し、その上澄液 0.2 ml を 4 ml の S 培地 (2 g/L KH_2PO_4 、2 g/L K_2HPO_4 、0.3 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5 g/L グリセリン、3 g/L NaCl 、1 g/L 粉末酵母エキス、0.004 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.0005 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.0005 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (pH 7.5)、高圧蒸気殺菌後除菌フィルターで濾過した 2-オキシグルタル酸又はピルビン酸、及び (R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンをそれぞれ最終濃度 1.5 g/L、1.0 g/L となるように添加)に加えて、30°C で 3~7 日間集積培養を行った。菌が生育した培養液を 1.5% 寒天を含む S 培地プレートに 0.2 ml ずつ塗り付け、30°C にて培養を行って生育したコロニーについて、それぞれ S 培地で振盪培養し、菌体を集菌後 0.1 M 炭酸緩衝液 (pH 8.5)、50 mM ピルビン酸、30 mM (R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンを含む 0.25 ml の反応液に懸濁し、30°C で攪拌しながら 24 時間反応させた。

この反応液を薄層クロマトグラフィー (Kieselgel 60F254 (Merck))、展開液はジエチルエーテル:メタノール:アンモニア水 (27%) = 50:50:2) で分離し、基質の減少をニンヒドリンで、生成物 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノンの生成を 0.4% 2,4-ジヒドロフェニルヒドラジンで検出した。目的生成物の生成が確認できた菌株については、その逆反応を行うことによって (R) 選択的アミノ基転移反応活性の有無を調べた。即ち、0.6% 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、0.6% (R)-1-フェニルエチルアミンを含む溶液中に培養した菌体を入れて 30°C で 2

日間反応させた。その結果、(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンの生成が認められ、アルスロバクター・スピーシーズKNK168株に(R)選択的なアミノ基転移活性を認めた。

実施例 2

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株を実施例1に示す方法によって培養を行う際に、培地中に(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパン((R)-DMA)の代わりに、(RS)-1-メチルプロピルアミン、(RS)-1-メチルブチルアミン、(RS)-3-アミノ-2,2-ジメチルブタン、(RS)-2-アミノ-1-ブタノール、又は(RS)-1-フェニルエチルアミンを添加した。その培養液から菌体を分離し、この菌体を用いて1% 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、1% (RS)-1-メチルプロピルアミンを含む反応液中で30℃、20時間反応を行ったところ、表4に示すように反応性の向上がみられた。

表 4

誘導物質	生成 (R)-DMA (%)
(RS)-1-メチルプロピルアミン	22.3
(RS)-1-メチルブチルアミン	13.0
(RS)-1-フェニルエチルアミン	8.0
(RS)-3-アミノ-2,2-ジメチルブタン	18.6
(RS)-2-アミノ-1-ブタノール	12.9
(R)-DMA	0.9
無添加	0.3

実施例 3

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株をR培地（5 g/L KH_2PO_4 、5 g/L K_2HPO_4 、3 g/L NaCl 、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.005 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001 g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ （pH7.5）、15 g/L グリセリン、2 g/L 粉末酵母エキス、8 g/L プロエキス（播州調味料製）、高圧蒸気殺菌後除菌フィルターで濾過したピルビン酸、及び（RS）-1-メチルプロピルアミンをそれぞれ最終濃度1.6 g/L、2.0 g/Lとなるように添加、pH7.2に調製）に接種して、30℃で24時間振盪培養した。その培養菌体を遠心分離により集菌し、1% 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、0.1% トリトン X-100と表5に示すアミノ基供与体1%を含む反応液（pH8.5）中に懸濁して35℃、20時間反応させた。表5に示すように、（RS）-1-フェニルエチルアミン、（RS）-1-メチルブチルアミン、（RS）-1-メチルプロピルアミン及び（RS）-1-メチルブチルアミン等がアミノ基供与体として働くことがわかったが、（RS）-1-フェニルエチルアミンが最も良好であった。

表 5

アミノ 供与体	生成 (R)-DMA (%)
(RS) - 1 - フェニルエチルアミン	61.3
(RS) - 1 - メチルブチルアミン	54.7
(RS) - 1 - メチルプロピルアミン	28.2
(RS) - 1 - メチルブチルアミン	56.9
(RS) - 2 - アミノ - 1 - プロパノール	9.6
(RS) - 2 - アミノ - 2 - フェニルエタノール	48.4
(RS) - 2 - アミノ - 3 - フェニルプロパノール	22.7
(RS) - 2 - アミノ - 4 - フェニルブタン	27.6
(RS) - 1 - アミノ - 2 - フェニルプロパン	1.8
(RS) - 1 - フェニルメチルアミン	3.1
(RS) - 3 - アミノヘプタン	7.4
(R) - 1 - ナフチルエチルアミン	34.2
D - アラニンメチルエステル	3.5
D - アラニンエチルエステル	4.2
D - アラニン	3.0

実施例 4

アルスロバクター・スピーシーズKNK 168株をR培地で培養して得た菌体を、2% 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、4% (RS)-1-フェニルエチルアミンを含む反応液に懸濁し、表6に示す界面活性剤や脂肪酸を添加して、30℃、pH 8.5で20時間反応させた。その結果、反応液にドデシル硫酸ナトリウムやリノール酸、オレイン酸等を添加することによって、反応生成物の収率が向上することが判った。

表 6

添加物 (%)		生成 (R) - DMA (%)
トリトン X-100	0.1	31.6
	0.5	34.0
ドデシル硫酸ナトリウム	0.1	45.3
	0.5	42.2
	1.0	46.3
	2.0	50.1
	3.0	51.9
	4.0	53.1
臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB)	0.1	29.1
リノール酸	2.9	45.1
オレイン酸	2.9	44.9
(無添加)		28.1

実施例 5

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株をR培地で培養した菌体を用い、2% 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、1.4% (RS)-1-フェニルエチルアミン、0.1% ドデシル硫酸ナトリウムを含む反応液のpHを7.5~9.5まで変化させて35℃で20時間反応を行った。その結果、表7に示すように、pH8.5~9.0での反応生成物の収率が良好であった。

表 7

反応pH	生成 (R) - DMA (%)
7.5	16.8
8.0	30.8
8.5	40.0
9.0	41.6
9.5	36.1

実施例 6

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株を2リットル容ミニジャーを用い、1.5リットルのJ培地(5g/L KH_2PO_4 、5g/L K_2HPO_4 、1g/L NaCl 、1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.005g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.001g/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.0005g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (pH7.5)、40g/L グリセリン、3g/L 粉末酵母エキス、20g/L プロエキス(播州調味料製)、pH7.5に調整)に30mlの一晩前培養液を植菌し、30℃、0.5vvm、450rpmで43時間、10%水酸化ナトリウムを用いてpHを7.5に調整しながら培養した。なお、培養開始後、14時間後に最終濃度4g/Lとなるように除菌フィルターで濾過した(RS)-1-メチルプロピルアミンを添加して培養した。培養終了時の到達菌体濃度(OD_{610})は約2.9で、その時のトランスアミナーゼ活性は培養液当たり0.3単位であった。なお、酵素活性単位は、30℃で1 μM の基質1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノンを用いて(RS)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンに転換する酵素活性量を示す。

培養液 1. 5リットルから集菌した菌体を用いて、45 gの1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、28.3 gの(R)-1-フェニルエチルアミン、65.0 gのオレイン酸を含む反応液(pH 8.5)に懸濁し、30℃で39時間反応させたところ、基質の81.6%が(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンに転換した。この反応液のpHを塩酸で2.0に調整した後、トルエンを用いて抽出し有機層にケトン類を移行させて分離した。水層のpHを水酸化ナトリウムで12に調整した後、再びトルエンを用いて抽出したところ、有機層に32.9 gの(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンが含まれていた。この抽出物から蒸留によって目的化合物の分離を試みたところ、その主留画分に30.3 gの(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンが含まれていた。この一連の操作による総合収率は、約68.7%であり、光学純度は99.6% ee (R体)であった。

実施例 7

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株を400 mlのR培地の入った坂口フラスコ中で30℃、30時間振盪培養した。集菌後、40 mlの20 mMリン酸カリウム緩衝液(pH 6.8)、0.1%の2-メルカプトエタノールに懸濁し、超音波によって菌体を破碎した後、遠心分離により沈殿物を除去して得られる上清として無細胞抽出液34 mlを得た。

この無細胞抽出液10 mlを用い、0.5 gの1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、0.34 gの(R)-1-フェニルエチルアミンを含む0.1 Mトリス-塩酸緩衝液(pH 8.5)よりなる100 mlの反応液で、30℃、24時間反応させた。その結果、0.36 gの(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンが生成した。

実施例 8

実施例 7と同様にしてアルスロバクター・スピーシーズKNK168株を培養

し、その1mlから菌体を分離した。これを1mlの0.1Mトリス塩酸緩衝液(pH8.5)、ラセミ体の1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパン40mg、ピルビン酸20mg、ドデシル硫酸ナトリウム2%を含む反応液に懸濁し、30℃で48時間、攪拌しながら反応させた。その反応後の溶液の分析を行ったところ、1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパンが20.5mg残存しており、その光学純度は96%ee(S体)であった。

実施例9

実施例6と同様に、アルスロバクター・スピーシーズKNK168株を5リットル容ミニジャーを用い、3.5リットルのJ培地で30℃、43時間培養した。菌体を遠心分離によって集め、1リットルの20mMリン酸カリウム緩衝液(pH6.8)、0.01%の2-メルカプトエタノールに懸濁し、ダイノミル(Dynomill(登録商標)、スイス)で破碎後、遠心して上清810mlを分離した。これに、硫酸プロタミンを50mg/mlとなるように添加し核酸を除き、30%飽和となるように硫酸を添加して沈澱したタンパク質を除いた後、60%飽和となるように硫酸を添加して沈澱したタンパク質を分離した。これを上記緩衝液に溶解させ、同緩衝液に対して透析した後、20%(v/v)グリセリン、0.3M NaCl、20μMピリドキサルリン酸となるように添加した同緩衝液組成に調整後、この液で平衡化したDEAE-セファロースファストフロー(ファルマシア)カラム(φ4.4×20cm)に供し、0.3~0.5M NaCl直線濃度勾配によって溶出させた。

この活性画分を集め透析後、0.2Mとなるように硫酸を添加した後、0.3M NaClのかわりに0.2M硫酸を含む前記緩衝液で平衡化したフェニルセファロース(ファルマシア)カラム(φ2.2×17cm)に供し、0.2~0.6Mの硫酸の直線濃度勾配により溶出した。この活性画分の硫酸濃度を0.6Mに調整した後、0.2M硫酸のかわりに0.6M硫酸を含む前期緩衝液で平衡

実施例 9 で得られた精製酵素タンパク質を用いて、ピルビン酸をアミノ基受容体として、種々のアミノ化合物に対する反応性を調べた。150 μ l の基質溶液 (0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8.3)、40 mM ピルビン酸、0.1 mM ピリドキサルリン酸、40 mM 各種アミノ化合物) に 10 倍希釈した精製酵素タンパク質溶液 150 μ l を添加し、30 $^{\circ}$ C で 1 時間チューブ内で反応させた。反応チューブを沸騰水中に移して反応停止後、反応液の一部を 5 倍希釈し、その 10 μ l に 0.1 M ホウ酸緩衝液 (pH 8.0) 10 μ l、80 mM 4-フルオロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾキサジアゾール (NBD-F) のエタノール溶液 20 μ l を添加し、60 $^{\circ}$ C で 1 分間反応後氷冷し、5 mM HCl 460 μ l を添加した。この反応液をファインパック C18-5 カラム (日本分光社製) I、0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5)、CH₃CN (90:10) を溶離液として高速液体クロマトグラフィーで分析し、励起波長を 470 nm とし、530 nm で NBD 化したアラニンの検出を行った。その結果を (R)-1-フェニルエチルアミンを基質とした時の相対活性で表 8 に示す。

表 8 から明らかなように (S)-2-フェニルグリシノール、3-アミノフェニルブタン等が良好な反応性を示した。

化したブチルセファロース（ファルマシア）カラム（ $\phi 2.2 \times 17$ cm）に供し、0.6～0.2 M硫酸の直線濃度勾配によって溶出した。この活性画分を集め、限外濾過で濃縮した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ、分子量約37,000に相当するところに、ほぼ単一のバンドを形成していた。

実施例 10

実施例 9 で得られた精製酵素タンパク質を気相プロテインシーケンサー（470 A 型、アプライド・バイオシステム社）にて分析することにより、アミノ末端のアミノ酸配列を調べた。その結果、当該酵素タンパク質は、アミノ末端付近に配列表の配列番号：3 及び配列番号：4 で示される 2 種類のアミノ酸配列を持つことが分かった。配列番号：4 で示されるアミノ酸配列をアミノ末端に持つ酵素タンパク質に比べて配列番号：3 で示されるアミノ酸配列をアミノ末端に持つ酵素タンパク質は微量であった。両配列の比較より、アミノ末端付近のプロセッシングにより、配列番号：3 から配列番号：4 で示されるアミノ酸配列をアミノ末端に持つトランスアミナーゼが生成したと推定された。

精製トランスアミナーゼ 100 μ g（50 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）、10% グリセリン、0.005%メルカプトエタノール、10 μ M ピリドキサルリン酸）に 8 μ g の TPCK トリプシンを加え、37°C で 24 時間処理した。得られた消化物を、HPLC（YMC Co. Ltd. 製、YMC-Pack PROTEIN-RP カラム、流速 1 mL/分、溶出液 A：0.1% トリフルオロ酢酸、溶出液 B：0.1% トリフルオロ酢酸、80% アセトニトリル、溶出条件：溶出液 A が 90%、溶出液 B が 10% である混合溶液で平衡化したカラムにサンプルをアプライし、90 分間で溶出液 B の割合を 100% にあげる。）で分離精製した。各ペプチド断片についてアミノ酸配列分析を前述の方法で行った。その結果、配列番号：5、配列番号：6 の部分アミノ酸配列を得た。

実施例 11

表 8

化 合 物	相対活性 (%)
(R) - 1 - フェニルエチルアミン	100
(R) - 1 - (3, 4-ジメチルフェニル)-2-アミノプロパン	30
1 - メチルヘプチルアミン	47
1 - メチルヘキシルアミン	37
1 - メチルプロピルアミン	1.2
ベンジルアミン	0.8
(S) - 2 - フェニルグリシノール	180
3 - アミノフェニルブタン	84
L - フェニルアラニノール	0.8
(S) - 1 - フェニルエチルアミン	0
(R) - 2 - フェニルグリシノール	0

実施例 1 2

実施例 9 で得られた精製酵素タンパク質を用いて、(R) - 1 - フェニルエチルアミンをアミノ基供与体として、種々のカルボニル化合物に対する反応性について調べた。200 μ l の基質溶液 (0.1 M Tris \cdot HCl 緩衝液 (pH 8.5)、25 mM (R) - 1 - フェニルエチルアミン、0.1 mM ピリドキサルリン酸、25 mM 各種カルボニル化合物) に精製酵素タンパク質溶液 50 μ l を添加し、30 $^{\circ}$ C で 1 ~ 3 時間チューブ内で反応させた。反応チューブを沸騰水中に移して反応停止後、反応液をメタノールで 5 倍希釈した。この希釈液をファインパック C18 - 5 カラムで、メタノール - 水 (20 : 80) を溶離液として、高速液体クロマトグラフィーで分析し、反応により生成したアセトフェノンの定量を行った。その時の結果をピルビン酸を基質とした時の相対活性で表 9

に示す。表 9 から明らかなように、オキザロ酢酸やフェノキシ-2-プロパノン等も良好な反応性を示した。

表 9

化 合 物	相対活性 (%)
ピルビン酸	100
オキザロ酢酸	87
グリオキシル酸	4
2-ケト酪酸	7
ピルビン酸エチル	27
アセト酢酸エチル	4
2-デカン	3
4-メトキシフェニルアセトン	14
1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン	7
ベンジルアセトン	3
4-(4-メトキシフェニル)-2-ブタノン	7
1-フェニル-2-ブタノン	1
フェニルアセトアルデヒド	13
ベンゾイル酢酸エチル	2
フェノキシ-2-プロパノン	83
ジアセチル	10
1-メトキシ-2-プロパノン	16
1-テトラロン	1
2-アセチルピリジン	19
3-アセチルピリジン	8
4-アセチルピリジン	27
3-アセトキシピリジン	1
2-アセチルピラジン	17
2-アセチルフラン	2
2-アセチルチオフェン	1
2-アセチルチアゾール	10

実施例 1 3

実施例 7 と同様にしてアルスロバクター・スピーシーズKNK 1 6 8 株を培養し、その培養液 1 m l から菌体を分離した。これを 1 m l の 0. 1 M トリス塩酸緩衝液 (p H 8. 5)、1 0 0 m M (R) - 1 - フェニルエチルアミン、1 0 0 m M メトキシ - 2 - プロパノン、0. 1 % ドデシル硫酸ナトリウムを含む反応液に懸濁し、3 0 °C で 2 0 時間攪拌しながら反応させた。この反応液の分析を行ったところ、基質であるメトキシ - 2 - プロパノンがほとんど消失して 2 - アミノ - 1 - メトキシプロパンに転換しており、その光学純度は 9 9. 4 % e e [(R) 体] であった。

実施例 1 4

実施例 1 3 と同様にしてアルスロバクター・スピーシーズKNK 1 6 8 株を培養し、その培養液 1 m l から菌体を分離した。これを 1 m l の 0. 1 M トリス塩酸緩衝液 (p H 8. 5)、ラセミ体の 2 - アミノ - 1 - メトキシプロパン 5 0 m g、ピルビン酸 3 7. 5 m g、ドデシル硫酸ナトリウム 0. 1 % を含む反応液に懸濁し、3 0 °C で 2 4 時間、攪拌しながら反応させた。この反応後の分析を行ったところ、2 - アミノ - 1 - メトキシプロパンが 2 3. 4 m g 残存しており、その光学純度は 9 5 % e e [(S) 体] であった。

実施例 1 5

実施例 1 4 と同様の反応で、2 0 0 m M のラセミ体の 2 - アミノ - 1 - メトキシプロパン、1 5 0 m M の n - ブチルアルデヒド又はプロピオンアルデヒドを用い、3 0 °C で 2 0 時間反応させた。その分析の結果、(S) 体の 2 - アミノ - 1 - メトキシプロパンが濃縮されており、(S) 体の比率が、n - ブチルアルデヒドを用いた場合で 7 6 %、プロピオンアルデヒドを用いた場合で 5 8 % となっていた。

実施例 1 6

実施例 9 で得られた精製酵素タンパク質を用いて、p H が活性に及ぼす影響を

調べた。20 μmol 1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-プロパノン、20 μmol (R)-1-フェニルエチルアミン及び1 μmol ピリドキサルリン酸を含み、以下に示す緩衝液によってpHを調整した0.9 mlの溶液に、適当に希釈した酵素タンパク質溶液0.1 mlを添加し、30°Cで1時間反応させた。使用した緩衝液はいずれも最終濃度0.1 Mで酢酸緩衝液(CH₃COONaと省略、pH 4~6)リン酸カリウム緩衝液(KPB、pH 5~8)及びトリス塩酸緩衝液(Tris·HCl、pH 7~10)である。反応後の反応液について生成した(R)-DMAを高速液体クロマトグラフィーで定量し、pH 8.5の活性を100%としてそれぞれのpHでの相対活性を第1図に示した。本酵素タンパク質は、pH 8.5付近(pH 7.5~9.0)が至適pHであることがわかった。

実施例 17

実施例9で得られた精製酵素タンパク質を用いて、pHが酵素の安定性に及ぼす影響を調べた。酵素タンパク質溶液のpHをHCl又はNaOHで各pHに調整後、20°Cで23時間保温した後、実施例16と同様にしてpH 8.5で反応させ、生成した(R)-DMAを定量した。その結果を未処理の酵素タンパク質溶液の活性を100%として各々のpHでの処理サンプルの活性を相対活性で第2図に示した。本酵素タンパク質は、pH 7付近が最も安定であることがわかった。

実施例 18

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株より染色体DNAの調製を行った。下記に示す培地30 mlの入った500 ml坂口フラスコにアルスロバクター・スピーシーズKNK168を植菌した。30°Cにて2日間振とう培養した後、培養液を遠心分離し菌体を集めた。菌体を10 mMトリス塩酸緩衝液pH 8.0、1 mM EDTA(TEと略す)に懸濁した後、Current Protocol in Molecular Biology(F Ausubel等、Willy Interscience)の方法に従って染色体D

NAを調製した。ただし、この方法で使用するSDS処理濃度を0.5%から2%に変更した。15mlの培養液から約6.5mgの染色体DNAを得た。

培地組成

グリセリン	2重量%
イーストエキス	0.8重量%
KH_2PO_4	0.5重量%
K_2HPO_4	0.5重量%
B液	10容量%
蒸留水	残量
	pH 7.5

B液組成

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	80g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	9g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.5g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1g
NaCl	10g
	/ 10L

実施例19

プラスミドライブラリーの作製をT. Maniatisらの方法 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Press) により作製した。染色体DNAを制限酵素Sau3AIによって部分分解し、アガロースゲル電気泳動を行った。約6~12kbのDNAを含むゲルを切り出し、SUPREC™-01 (宝酒造 (株) 製) を用いて精製した。pUC19を制限酵素BamHIで切断し、アルカリホスファターゼによって脱リン酸を行った。このように処理したpUC19と部分分解した染色体DNAをDNA Ligation kit ver2 (宝酒造 (株) 製) を用いて連結した。大腸菌JM10

9 を形質転換し、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリン、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ X-GAL (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド)、 $100 \mu\text{M}$ IPTG (イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド) を含む L 培地にプレーティングした。染色体 DNA を組み込まれた pUC19 は白色のコロニーを形成し、一方、染色体 DNA を組み込まれていない pUC19 は青色のコロニーを形成するので容易に判別することができる。

実施例 20

実施例 10 によって得られた配列表の配列番号：3、配列番号：4、及び配列番号：5 に示されるアミノ酸配列から、配列番号：7 (AT-1) 及び配列番号：8 (AT-3) に示されるオリゴヌクレオチドを合成した。

AT-1 と AT-3 をプライマー DNA として、アルスロバクター・スピーシーズ KNK168 株の染色体 DNA をテンプレートとして PCR 反応を行った。DNA ポリメラーゼとして TaKaRa Ex Taq (宝酒造 (株) 製) を用い、反応組成は同プロトコールに準じた。反応温度条件は下記の条件で行った。

1) 94°C 2分間

2) 94°C 1分間

3) 44°C 1分間

4) 68°C 2分間

5) 68°C 5分間

2) ~ 4) を 30 サイクル

反応終了後、6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて生成物を調べた結果、約 450 bp の増幅 DNA 断片が少ないながらも確認できた。

約 450 bp の DNA 断片を含むゲルを切りだし、ガラス棒にて粉碎後、TE 緩衝液にて抽出し、精製した。このフラグメントを Regular pT7Blue T-vector kit (Novagen 社製) を用いて pT7Blue Vector にクローニングし、pAT1 を得た。pA

T1の挿入断片について(株)パーキンエルマージャパンのDNA sequencing kit(Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction)を用い、ABI373A DNA シーケンサー(パーキンエルマー(株)製)によって塩基配列を決定した。その結果、実施例10で得た配列番号:3、配列番号:4、配列番号:5、及び配列番号:6に示されるアミノ酸配列に対応する塩基配列が存在することが明らかになった。pAT1の挿入DNA断片(約450bp)の塩基配列を配列表の配列番号:21に示した。

実施例21

pAT1をBamHIで切断し、アガロースゲル電気泳動によって分離した約450bpのDNA断片含むゲルを切りだし、SUPUREC™-01(宝酒造(株)製)を用いて同DNA断片を精製した。このDNA断片をRandom Primer DNA Labeling kit Ver.2(宝酒造(株)製)を用いて[α -³²P]dCTPで放射能標識し、プローブとして用いた。実施例19で作製したプラスミドライブラリーに対して同プローブでコロニーハイブリダイゼーションを行い、スクリーニングした。コロニーハイブリダイゼーションはT.Maniatisらの方法(T.Maniatisら、Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Press)に従って行った。約2000株のクローンからなるプラスミドライブラリーをスクリーニングした結果、2株の陽性クローンJM109(pAT11)とJM109(pAT17)を得た。pAT11は約8kb、pAT17は約10.5kbの染色体DNA断片が挿入されていた。

pAT11を種々の制限酵素で切断し制限酵素地図を作製した(第3図)。pAT1の挿入DNA断片の塩基配列(配列番号:21)とpAT11の制限酵素地図を比較した結果と、トランスアミナーゼの分子量(MW37,000)から推定されるORF(約1kb)の大きさより、pAT11のPstI切断によって得られる約1.6kbのDNA断片に当該遺伝子の全長が含まれていることが示唆された。

pAT11をPstIで切断し、アガロース電気泳動し、1.6kbのDNA断片を含むゲルを切り出し、SUPUREC™-01(宝酒造(株)製)を用いて抽出精製した。

pUC19 をPstIで切断し、1.6 kbのDNA断片と混合し、DNA Ligation kit Ver.2 (宝酒造 (株) 製) を用いてライゲーションを行った。ライゲーションしたDNAで大腸菌JM109 を形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドDNAを調製した。このプラスミドDNAをPst Iを含む種々の制限酵素で切断し解析を行った結果、挿入方向の異なるpAT22、pAT23 が得られたことが分かった。簡単なpAT22、pAT23 の制限酵素地図を第3図に示した。前記pAT22を保持する菌は、E. coli JM109 (pAT22) と命名され、平成9年4月8日 (原寄託日) より受託番号: FERM BP-5902として通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所〔あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305-0046)〕に寄託されている。

1.6 kbのPst I断片の塩基配列を決定するために、種々のプラスミドDNAを作製した。pAT11 をEcoRI とSmaIにてそれぞれ切断しDNA Ligation kit ver.2 (宝酒造 (株) 製) を用いてライゲーションを行った。ライゲーションしたDNAで大腸菌JM109 をそれぞれ形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、種々の制限酵素で切断した結果、それぞれ挿入DNA断片内のStuI近傍のEcoRI、SmaI部位からベクターのEcoRI、SmaI部位まで欠失したプラスミドpAT20、pAT21 をそれぞれ得たことが分かった。pAT22 をSma IとStuIで切断し、DNA Ligation kit Ver.2 (宝酒造 (株) 製) を用いてライゲーションをした。ライゲーションしたDNAで大腸菌JM109 を形質転換し、形質転換体を得た。得られた形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、種々の制限酵素で切断し解析した結果、約350 bpのSmaI-StuI断片の欠失したプラスミドpAT26 を得たことが分かった。pAT23 をEcoRI で切断し同様にライゲーションを行い、大腸菌JM109 を形質転換した。

形質転換体よりプラスミドDNAを調製し、種々の制限酵素で解析した結果、ベクターのEcoRI から挿入DNA断片内のEcoRI 部位までの約900 bpの欠失したプラスミドpAT24 を得たことが分かった。pAT23 をSmaIで切断し同様にライ

ゲーションを行い大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体よりプラスミドDNAを調製し種々の制限酵素で解析した結果、ベクターのSmaIから挿入DNA断片内のSmaI部位までの約1,100 bpを欠失したプラスミドpAT25を得たことが分かった。pAT22をSalIで切断し、同様にライゲーションを行い大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体よりプラスミドDNAを調製し種々の制限酵素で解析した結果ベクターのSalIから挿入DNA断片内のSalI部位までの約200 bpの欠失したプラスミドpAT27を得た。pAT20からpAT27までの各プラスミドの作製方法と簡単な制限酵素地図を第3図に示した。

これらのプラスミドDNAをテンプレートとし、M13-47（宝酒造（株）製）、RV-M（宝酒造（株）製）をプライマーDNAとして用い、実施例20で示した方法によって塩基配列を決定した。また、この様にして順次決定された塩基配列に基づいて、配列番号：9～15のオリゴヌクレオチドを合成し、配列表の配列番号：9～15のオリゴヌクレオチド（AT-6～9、11、12、18）をプライマーとしてさらに塩基配列を決定した。こうして決定した1.6 kbのPstI断片の塩基配列を配列表の配列番号：16に示した。

配列番号：16の塩基配列に対応するアミノ酸配列を、実施例10で決定したアミノ末端付近のアミノ酸配列（配列番号：3および4）と比較した結果、トランスアミナーゼをコードする遺伝子の翻訳は、配列番号：16の塩基配列の386番から388番のGTGから開始されることが分かった。またアルスロバクター・スピーシーズKNK168より調製されたトランスアミナーゼの大部分は、アミノ末端メチオニンより6アミノ酸が切断除去され、アミノ末端がスレオニンであることが判った。タンパク質をコードする領域に対応するアミノ酸配列と塩基配列は、それぞれ配列表の配列番号：1と配列番号：2に示されている。

実施例22

トランスアミナーゼを大腸菌において生産するために当該遺伝子の発現ベクターの構築を行った。発現ベクターとしてラクトースオペロンのプロモーターを有

するpUCNT(WO/03613)を用いた。

トランスアミナーゼ遺伝子を発現ベクターに挿入するために必要な制限酵素部位を導入するためにPCR法を行った。アミノ末端プライマーDNAとして配列番号：17～19(AT-13～15)、カルボキシル末端プライマーDNAとして配列番号：20(AT-16)のオリゴヌクレオチドを合成した。AT-13は翻訳開始コドンGTGをATGに変更するためであり、AT-14は翻訳開始コドンとして5番目のAsp コドンGATをATGに変更するために合成した。またAT-15は翻訳開始コドンGTGをそのまま用いるために作製した。

3種類のアミノ末端プライマーDNAとカルボキシル末端プライマーDNAを用いてそれぞれPCRを行った。PCRはTaKaRa Ex Taq を使用し、下記の温度条件にて実施した。

- 1) 94℃ 2分間
- 2) 94℃ 1分間
- 3) 50℃ 1分間
- 4) 68℃ 2分間
- 5) 68℃ 5分間

2)～4)を30サイクル

それぞれ約1kbのDNA断片の増幅が認められた。AT-13とAT-16をプライマーDNAとして用いたPCRにより増幅したDNA断片と、AT-14とAT-16をプライマーDNAとして用いたPCRにより増幅したDNA断片をNde IとBamH Iによって切断し、0.8%アガロースゲル電気泳動にて分離し、DNA断片を含むゲルを切り出して、DNA断片をSUPREC™-01(宝酒造(株)製)にて抽出精製した。これらのDNA断片を、Nde IとBamH Iで切断しアガロースゲル電気泳動し、切り出したゲルからSUPREC™-01(宝酒造(株)製)にて抽出精製したpUCNTとDNA Ligation kit ver. 2(宝酒造(株)製)を用いてライゲーションを行

い、それぞれで大腸菌 JM109 を形質転換した。形質転換体よりプラスミド DNA を調製し解析した結果、それぞれトランスアミナーゼ遺伝子の挿入された発現プラスミド pAT28、pAT29 が得られた。

AT-15 と AT-16 をプライマー DNA として用いた PCR により増幅した DNA 断片を PmaCI と BamHI で切断し 0.8% アガロースゲル電気泳動にて分離し、DNA 断片を含むゲルを切り出して、SUPREC™-01 (宝酒造 (株) 製) にて抽出精製を行った。pUCNT を NdeI で切断し DNA Blunting kit (宝酒造 (株) 製) にて切断部位を平滑にした後、BamHI にて切断した。その後、0.8% アガロースゲル電気泳動にて DNA 断片を分離し、DNA 断片を含むゲルを切り出して、SUPREC™-01 (宝酒造 (株) 製) にて抽出精製した。このようにして調製した DNA 断片とベクターをライゲーションし、大腸菌 JM109 を形質転換した。形質転換体よりプラスミド DNA を調製し解析した結果、トランスアミナーゼ遺伝子の挿入されたプラスミド pAT30 を得たことが分かった。

実施例 23

実施例 22 で作製した pAT28 を保持する大腸菌 JM109、〔以下、E. coli JM109 (pAT28) のように略記する〕、E. coli JM109 (pAT29)、E. coli JM109 (pAT30) を用いてトランスアミナーゼの発現 (生産) を行った。対照として E. coli JM109 (pUCNT) を用いた。また実施例 9 で示したアルスロバクター・スピーシーズ KNK168 のダイノミルによる粉碎後の遠心上清液も、対照として用いた。

それぞれの株を 100 μ g/ml IPTG、100 μ g/ml アンピシリンを含有する 10 ml の L 培地の入った試験管 (直径 22 mm、長さ 220 mm) に植菌した後、37°C で一晩振とう培養した。こうして得た培養液 1.5 ml を遠心分離 (15,000 rpm, 5 分, 4°C) して集菌した。4°C に冷却した 20

mMリン酸緩衝液 pH 6.8、20 μ Mピリドキサルリン酸、0.01% 2-メルカプトエタノールから成る抽出バッファー1mlを加え菌体を懸濁した。この懸濁液を氷上にて超音波破碎（トミー精工（株）Handy sonic model UR-20P、power maxにて90秒 2回）し、15000 rpm 4°C、10分の遠心分離を行い、細胞残渣を除き、上清を粗酵素タンパク質溶液とした。

トランスアミナーゼ活性は次のようにして測定した。25mM (R)-フェニルエチルアミン、25mMピルビン酸、0.1mMピリドキサルリン酸、100mMトリス塩酸緩衝液 pH 8.5から成る基質溶液0.8mlに酵素タンパク質溶液0.2mlを加え、30°C、1時間反応させた。沸騰水中にて3分間加熱し反応を停止した。

反応生成物であるアセトフェノンをHPLCにて分析することによって、酵素活性を求めた。分析条件を以下に示す。なお、トランスアミナーゼの量は、精製トランスアミナーゼの比活性より推定される値である。

HPLCカラム：日本分光社製 Finepac SIL C18-5
 展開溶媒：アセトニトリル/水=25/75
 流速：1ml/min
 検出：210nm

アセトフェノンは約24分に検出される。結果を以下に示す。

菌株	トランスアミナーゼ (mg/L)
E. coli JM109(pAT28)	8.1
E. coli JM109(pAT29)	6.6
E. coli JM109(pAT30)	3.4
Arthrobactor sp. KNK168	1.9

実施例 24

アルスロバクター・スピーシーズKNK168株を実施例6と同様に酵素誘導

物質として (RS) - 1 - メチルプロピルアミンを用い振とう培養した。培養液 1 リットルから集菌した菌体を 0. 1 M トリス塩酸緩衝液 1 リットルに懸濁し、30 g の 1 - (3 - トリフルオロメチルフェニル) - 2 - プロパノン、18 g の (R) - 1 - フェニルエチルアミンを 44 g のオレイン酸を加え (pH 8. 5)、30 °C で 40 時間反応させた。反応後、実施例 6 と同様に抽出、蒸留し (R) - 1 - (3 - トリフルオロメチルフェニル) - 2 - アミノプロパンが 19. 5 g 得られた。光学純度は 100% ee、収率は 65% であった。

産業上の利用可能性

本発明により、従来合成の困難であった 1 位にアリアル基等を有する光学活性アミノ化合物等を高収率で容易に製造することが可能となる。また、本発明のポリペプチドは立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するものであり、本発明の製造方法に好適に用いることができる。また、本発明の DNA は本発明のポリペプチドをコードするものである。

配列表

配列番号： 1

配列の長さ： 3 2 5

配列の型： アミノ酸

鎖の数： 一本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： タンパク質

配列の特徴： 1 (Xaa は-NH₂、Met、Ala Phe Ser Ala Asp、又はMet Ala Phe Ser Ala Asp を示す。)

配列：

Xaa

ThrSerGluIleValTyrThrHisAspThrGlyLeuAspTyrIleThrTyrSerAspTyr
GluLeuAspProAlaAsnProLeuAlaGlyGlyAlaAlaTrpIleGluGlyAlaPheVal
ProProSerGluAlaArgIleSerIlePheAspGlnGlyTyrLeuHisSerAspValThr
TyrThrValPheHisValTrpAsnGlyAsnAlaPheArgLeuAspAspHisIleGluArg
LeuPheSerAsnAlaGluSerMetArgIleIleProProLeuThrGlnAspGluValLys
GluIleAlaLeuGluLeuValAlaLysThrGluLeuArgGluAlaPheValSerValSer
IleThrArgGlyTyrSerSerThrProGlyGluArgAspIleThrLysHisArgProGln
ValTyrMetTyrAlaValProTyrGlnTrpIleValProPheAspArgIleArgAspGly
ValHisAlaMetValAlaGlnSerValArgArgThrProArgSerSerIleAspProGln
ValLysAsnPheGlnTrpGlyAspLeuIleArgAlaValGlnGluThrHisAspArgGly
PheGluAlaProLeuLeuLeuAspGlyAspGlyLeuLeuAlaGluGlySerGlyPheAsn
ValValValIleLysAspGlyValValArgSerProGlyArgAlaAlaLeuProGlyIle
ThrArgLysThrValLeuGluIleAlaGluSerLeuGlyHisGluAlaIleLeuAlaAsp
IleThrLeuAlaGluLeuLeuAspAlaAspGluValLeuGlyCysThrThrAlaGlyGly
ValTrpProPheValSerValAspGlyAsnProIleSerAspGlyValProGlyProIle

ThrGlnSerIleIleArgArgTyrTrpGluLeuAsnValGluSerSerSerLeuLeuThr
ProValGlnTyr

配列番号：2

配列の長さ：976

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の特徴：1（NはGTGGCATTCA GCGCCGAT、ATGGCATTCA GCGCCGAT、又はATGを示す。）

配列：

N

ACCTCCGAGATCGTCTACACGCACGACACCGGCCTCGACTACATCACTTATAGCGACTACGAACTCGATCCT
GCTAACCCGCTCGCGGGAGGTGCGGCATGGATCGAGGGTGCATTCGTGCCGCCGTCGGAGGCGCGGATCTCG
ATCTTCGATCAGGGTTACCTCCACTCGGACGTCACCTACACGGTCTTCCACGTCTGGAACGGAAATGCATTC
CGCCTCGACGACCACATCGAACGCCTCTTCTCCAACGCGGAGTCGATGCGCATCATCCCTCCGCTCACACAG
GACGAAGTGAAGGAGATTGCGCTCGAACTCGTCGGAAGACCGAATTGCGTGAGGCCTTCGTGTCCGTGTCCG
ATTACCCGCGGTTACAGCTCGACTCCGGGCGAGCGGACATCACGAAGCACCGCCCGCAGGTGTACATGTAT
GCCGTCCCATATCAGTGGATCGTGCCGTTTGACCGAATTCGCGACGGCGTGCACGCCATGGTCCGACAGAGC
GTGCCCGAACCCCGCGCAGCTCGATCGACCCTCAGGTCAAGAACTTCCAGTGGGGGGATCTGATCCGTGCC
GTTCAAGAGACGCACGACCGCGGTTTCGAGGCTCCCTTCTGCTCGACGGCGATGGACTGCTTGCCGAGGGC
TCGGGGTTCAACGTCGTCGTGATCAAGGACGGCGTCGTGCCGAGCCCGGTTCGAGCGGCGCTCCCGGCATT
ACCGGAAGACCGTGCTCGAGATCGCCGAATCGCTCGGACACGAGGCGATTCTCGCCGACATCACGCTCGCT
GAACTGCTCGACGCCGACGAAGTCTCGGCTGCACGACTGCGGGCGGAGTGTGGCCATTCGTCAGCGTGGAC
GGCAACCCCATCTCGGACGGGGTTCCCGGCCCATCACCCAGTCGATCATCCGTCGTTACTGGGAGCTGAAT
GTCGAGAGCTCGTCGTTGCTTACGCCTGTGCAGTACTGA

配列番号 : 3

配列の長さ : 19

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列の特徴 : 1、2、15 (不明のアミノ酸)

配列 :

Xaa Xaa Ser Ala Asp Thr Ser Glu Ile Val Tyr Thr His Asp Xaa

Gly Leu Asp Tyr

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列 :

Thr Ser Glu Ile Val Tyr Thr His Asp Thr Gly Leu Asp Tyr Ile Thr

Tyr Ser Asp Tyr

配列番号 : 5

配列の長さ : 11

配列の型 : アミノ酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ala Val Pro Tyr Gln Trp Lys Val Pro Phe Asp

配列番号：6

配列の長さ：18

配列の型：アミノ酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ile Ser Ile Phe Asp Gln Gly Tyr Leu His Ser Asp Val Thr Tyr

Thr Val Phe

配列番号：7

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：RはAまたはG、YはCまたはT、HはA、CまたはT、およびNはA、C、GまたはTをそれぞれ示す。

配列：

CGCGGATCCG ARATHGTNTA YACNCAYGA

配列番号：8

配列の長さ：17

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列の特徴：RはAまたはG、YはCまたはT、およびNはA、C、GまたはTをそれぞれ示す。

配列：

ACYTTCCAYT GRTANGG

配列番号：9

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GCATCATCCC TCCGCTCACA

配列番号：10

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GAACTCGATC CTGCTAACCC

配列番号：1 1

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

TGTGAGCGGA GGGATGATGC

配列番号：1 2

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GCGGAGTGTG GCCATTCGTC

配列番号：1 3

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

GGCACGAATG CACCCTCGAT

配列番号：1 4

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CGTAGTCGCT ATAAGTGATG

配列番号：1 5

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

CCTTCTACGA CGACCCGAAG

配列番号：1 6

配列の長さ：1 5 7 4

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

配列 :

CTGCAGGCGCCCTACGAGCTCGTCCTCGAGGTCGCCGAGACCGGCAAGCTCCCCGTCGTTCTCTCACGGCC
GGTGGCGTCGCCACCCCGCGGATGCCGCGATGATGATGCAGCTCGGAGCAGACGGTGTCTTCGTGGCTCG
GGCATCTTCAAGTCGGGCAATCCCAGGAGCGCGCCGCTGCGATCGTCAAGGCTGTGGCCTTCTACGACGAC
CCGAAGGTCATCGCTGAGGTCTCGCGCGGTCTCGGAGAGGCCATGGTCGGCATCAACGTCGGCGACCTCCCC
GCTCCGCACCGACTCGCCGAGCGCGGGTGGTGACGACCCTCCACGAGATTCTGTCCGTGATTCCCCTCCTC
CGAACCCCATCAGAAAGGCACCACCGTGGCATTACAGCGCCGATACCTCCGAGATCGTCTACACGCACGACAC
CGGCCTCGACTACATCACTTATAGCGACTACGAACTCGATCCTGCTAACCCGCTCGCGGGAGGTGCGGCATG
GATCGAGGGTGCATTCGTGCCGCCGTGCGAGGGCGCGGATCTCGATCTTCGATCAGGGTTACCTCCACTCGGA
CGTCACCTACACGGTCTTCCACGTCTGGAACGGAAATGCATTCGGCCTCGACGACCACATCGAACGCCTCTT
CTCCAACGCGGAGTCGATGCGCATCATCCCTCCGCTCACACAGGACGAAGTGAAGGAGATTGCGCTCGAACT
CGTCGCGAAGACCGAATTGCGTGAGGCCTTCGTGTCCGTGTCGATTACCCGCGGTTACAGCTCGACTCCGGG
CGAGCGCGACATCACGAAGCACCGCCCGCAGGTGTACATGTATGCCGTCCATATCAGTGGATCGTGCCGTT
TGACCGAATTCGCGACGGCGTGCACGCCATGGTCGCACAGAGCGTGCGCCGAACCCCGCGCAGCTCGATCGA
CCCTCAGGTCAAGAACTTCCAGTGGGGGATCTGATCCGTGCGGTTCAAGAGACGCACGACCGGGGTTCGA
GGCTCCCCTTCTGCTCGACGGCGATGGACTGCTTGCCGAGGGCTCGGGGTTCAACGTCGTCGTGATCAAGGA
CGGCGTCGTGCGCAGCCCGGTCGAGCGGCGCTCCCCGGCATTACGCGGAAGACCGTGCTCGAGATCGCCGA
ATCGCTCGGACACGAGGCGATTCTCGCCGACATCACGCTCGCTGAACTGCTCGACGCCGACGAAGTGTCTCG
CTGCACGACTGCGGGCGGAGTGTGGCCATTCGTCAGCGTGGACGGCAACCCCATCTCGGACGGGGTTCCCGG
CCCCATCACCAGTCGATCATCCGTGCTTACTGGGAGCTGAATGTCGAGAGCTCGTCGTTGCTTACGCCTGT
GCAGTACTGAATCCGATCAGTGAGGGGTCGACATCTCTCGACCCCTCACGGCAACTCCCGAGAGGCAGGATG
TATGACAGCCGGTCAACGATCACGATCGACCGCGATGCCATCACGCACAACGTGCCCCGCATCGTGATGC
CACCGCGCCGAGTTCGGTGATCGCGGTGGTGAAGGCCGACGGCTACGGTCACGGCGCTGCAG

配列番号 : 17

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACACATATGG CATTACGCGC CGATACCTCC

配列番号：18

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

ACACATATGA CCTCCGAGAT CGTCTACACG

配列番号：19

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AGACACGTGG CATTACGCGC CGATACCTCC

配列番号：20

配列の長さ：30

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成DNA）

配列：

AGAGGATCCT CAGTACTGCA CAGGCGTAAG

配列番号：21

配列の長さ：465

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

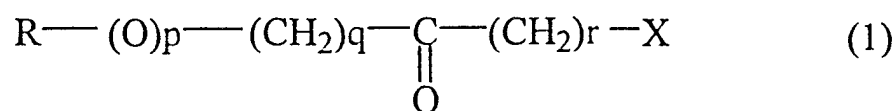
トポロジー：直鎖状

配列：

GGATCCGAGATTGTCTATACACACGACACCGGCCTCGACTACATCACTTATAGCGACTACGAACTCGATCCT
GCTAACCCGCTCGCGGGAGGTGCGGCATGGATCGAGGGTGCATTCGTGCCGCCGTCGGAGGGCGGGATCTCG
ATCTTCGATCAGGGTTACCTCCACTCGGACGTCACCTACACGGTCTTCCACGTCTGGAACGAAATGCATTC
CGCCTCGACGACCACATCGAACGCCTCTTCTCCAACGCGGAGTCGATGCGCATCATCCCTCCGCTCACACAG
GACGAAGTGAAGGAGATTGCGCTCGAACTCGTCGCGAAGACCGAATTGCGTGAGGCCTTCGTGTCCGTGTCTG
ATTACCCGCGTTACAGCTCGACTCCGGGGGAGCGCGACATCACGAAGCACCGCCCGCAGGTGTACATGTAT
GCCGTCCATACCAGTGAAAAGTAATCGGATCC

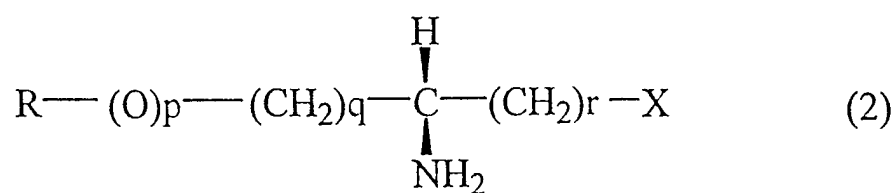
請 求 の 範 囲

1. 一般式(1)



(式中、pは0または1を示し、qは0～8の整数を示し、rは0～4の整数を示し、Rは炭素数6～14の置換または無置換のアリール基、炭素数4～12のヘテロアリール基、カルボシキル基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、メチル基、または水素原子のいずれかを示し、Xは水酸基、カルボシキル基、炭素数1～6のアルコキシカルボニル基、または水素原子のいずれかを示す。)に示されるケトン化合物をアミノ基受容体とし、アミノ基供与体である第一アミンの存在下、トランスアミナーゼを作用させて立体選択的にアミノ基転移を行わせることにより、

一般式(2)



(式中、p、q、r、R、Xは、それぞれ一般式(1)におけるp、q、r、R、Xと同じである。)に示される立体配置を有する光学活性アミノ化合物を得ることを特徴とする、光学活性アミノ化合物の製造方法。

2. (R)体選択的にアミノ基転移を行い、(R)体の光学活性アミノ化合物

を得る請求項 1 記載の製造方法。

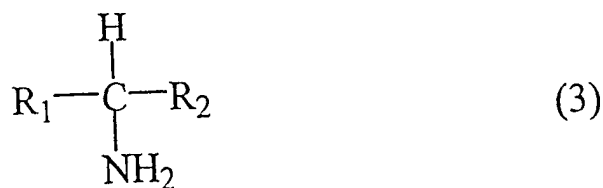
3. 置換アリアル基が、ハロゲン原子、炭素数 1～6 のアルキル基、水酸基、メトキシ基、モノフルオロメチル基、ジフルオロメチル基、及びトリフルオロメチル基からなる群より選択される一種以上の置換基により一ヶ所以上置換されたアリアル基である、請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

4. R がメチル基、フェニル基、2-メトキシフェニル基、3-メトキシフェニル基、4-メトキシフェニル基、2, 4-ジメトキシフェニル基、3, 4-ジメトキシフェニル基、2-トリフルオロメチルフェニル基、3-トリフルオロメチルフェニル基、及び 4-トリフルオロメチルフェニル基からなる群より選択される基である請求項 1～3 いずれか記載の製造方法。

5. ヘテロアリアル基がピリジル基、ピラジニル基、チエニル基、フリル基、及びチアゾリル基からなる群より選択される基である請求項 1 又は 2 記載の製造方法。

6. p が 0、q が 1、r が 1、X が水素原子である請求項 1～5 いずれか記載の製造方法。

7. 第一アミンが、一般式 (3)



(式中、 R_1 、 R_2 はそれぞれ独立して、水素原子、炭素数 1～14 の置換若しくは無置換のアルキル基、炭素数 6～14 の置換若しくは無置換のアリール基、炭素数 1～14 の置換若しくは無置換のアラルキル基、カルボキシル基、又は炭素数 1～10 のアルコキシカルボニル基を示し、 R_1 と R_2 は分子内で結合して環を形成してもよい。) に示される化合物である請求項 1～6 いずれか記載の製造方法。

8. R_1 が炭素数 1～10 のアルキル基、フェニル基、又はナフチル基のいずれかであり、そして R_2 がメチル基、エチル基、ヒドロキシメチル基、ヒドロキシエチル基、カルボキシル基、炭素数 1～10 のアルコキシカルボニル基、又はカルボキシメチル基のいずれかである請求項 7 記載の製造方法。

9. 第一アミンが (R) 体である請求項 1～8 いずれか記載の製造方法。

10. 第一アミンが、D-アラニンまたはアルキル基の炭素数が 1～10 である、D-アラニンのアルキルエステルである請求項 1～9 いずれか記載の製造方法。

11. 第一アミンが、(R)-1-フェニルエチルアミン、(R)-1-ナフチルエチルアミン、(R)-1-メチルプロピルアミン、(R)-1-メチルヘキシルアミン、(R)-2-アミノ-1-プロパノール、(R)-1-メチルブチルアミン、(R)-1-フェニルメチルアミン、(R)-1-アミノ-1-フェニルエタノール、(R)-2-アミノ-2-フェニルエタノール、(R)-3-アミノヘプタン、(R)-1-アミノ-3-フェニルプロパン、(R)-2-アミノ-4-フェニルブタン、(R)-2-アミノ-3-フェニルプロパノール、(R)-1-メチルヘプチルアミン、ベンジルアミン、(S)-2-フェニル

グリシノール、(R)-3-アミノフェニルブタン、L-フェニルアラニノール、(R)-2-アミノ-1-メトキシプロパン、D-アラニンメチルエステル、(R)-1-(3,4-ジメトキシフェニル)-2-アミノプロパン、(R)-1-フェニル-2-アミノプロパン、もしくはD-アラニンエチルエステルである、またはこれらのラセミ体である、請求項1~10いずれか記載の製造方法。

12. 立体選択的にアミノ基転移を行わせる活性を有するトランスアミナーゼを生産する微生物の培養物、分離した菌体、菌体処理物、または固定化菌体と、ケトン化合物及び第一アミンとを接触させる請求項1~11いずれか記載の製造方法。

13. 立体選択的にアミノ基転移を行わせる活性を有するトランスアミナーゼを生産する微生物の無細胞抽出物、部分精製酵素、精製酵素、または固定化酵素と、ケトン化合物及び第一アミンとを接触させる請求項1~11いずれか記載の製造方法。

14. トランスアミナーゼを生産する微生物がアルスロバクター (*Arthrobacter*) 属に属する微生物である請求項12又は13記載の製造方法。

15. アルスロバクター属に属する微生物がアルスロバクター・スピーシーズ (*Arthrobacter* sp.) KNK168 (FERM BP-5228) である請求項14記載の製造方法。

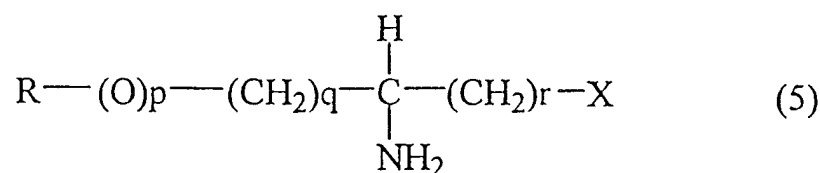
16. トランスアミナーゼを生産する微生物を培養する際に、該酵素の誘導物

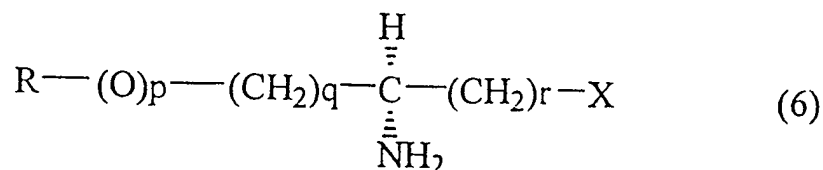
質として (RS) - 1 - メチルプロピルアミン、(RS) - 1 - フェニルエチルアミン、(RS) - 1 - メチルブチルアミン、(RS) - 3 - アミノ - 2, 2 - ジメチルブタン、(RS) - 2 - アミノ - 1 - ブタノール、及び (R) または (RS) - 1 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 2 - アミノプロパンからなる群より選択される一種以上のアミン類を培地に添加する請求項 12 ~ 15 いずれか記載の製造方法。

17. 5 ~ 12 の範囲の pH でトランスアミナーゼを作用させる請求項 1 ~ 16 いずれか記載の製造方法。

18. 反応促進物質としての界面活性剤又は脂肪酸を添加して、トランスアミナーゼを作用させる請求項 1 ~ 17 いずれか記載の製造方法。

19. 一般式 (4) で示されるケトン化合物の存在下、一般式 (5) で示されるラセミ体のアミノ化合物にトランスアミナーゼを作用させることにより、立体選択的にアミノ基転移反応を行い、一般式 (6) で示される光学活性アミノ化合物





(式中、R、p、q、r、X、R₁、R₂ は一般式(1)、一般式(3)におけるR、p、q、r、X、R₁、R₂ と同じである。)を得る、光学活性アミノ化合物の製造方法。

20. 立体選択的にアミノ基を転移させる活性(「立体選択的なトランスアミナーゼ活性」と略記する。)を有するポリペプチドをコードする塩基配列を含有してなるDNA。

21. ポリペプチドがアルスロバクター(Arthrobacter)属に属する菌株由来のものである請求項20記載のDNA。

22. 配列表の配列番号: 1に記載されたアミノ酸配列の全部又はその一部をコードするDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

23. 配列表の配列番号: 2に記載された塩基配列の全部又はその一部を含むDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

24. 配列表の配列番号: 2に記載された塩基配列において、1個以上の塩基が欠失、付加、挿入、または置換された塩基配列からなるDNAであって、かつ

立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

25. 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、または置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

26. アルスロバクター属に属する微生物の培養により得ることのできる、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド。

27. 配列表の配列番号：3、配列番号：4、又は配列番号：6に記載された部分アミノ酸配列を含み、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド。

28. 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列の全部又はその一部を含み、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド。

29. 配列表の配列番号：1に記載されたアミノ酸配列において、1個以上のアミノ酸残基が欠失、付加、挿入、または置換されたアミノ酸配列からなるポリペプチドであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチド。

30. 請求項20～25いずれか記載のDNAを含んでなる組換えDNA。

31. 微生物、動物若しくは動物細胞、又は植物若しくは植物細胞において、

コードされたポリペプチドを発現することができる請求項 30 記載の組換え DNA。

32. 請求項 30 又は 31 記載の組換え DNA を挿入されてなる、微生物、動物細胞又は植物細胞を宿主細胞とする発現ベクター。

33. 発現ベクターがプラスミド pAT28、pAT29、または pAT30 である請求項 32 記載の発現ベクター。

34. 請求項 32 又は 33 記載の発現ベクターにより形質転換されてなる形質転換体。

35. 形質転換体が大腸菌である請求項 34 記載の形質転換体。

36. 大腸菌が *E. coli* JM109 (pAT28)、*E. coli* JM109 (pAT29)、又は *E. coli* JM109 (pAT30) である請求項 35 記載の形質転換体。

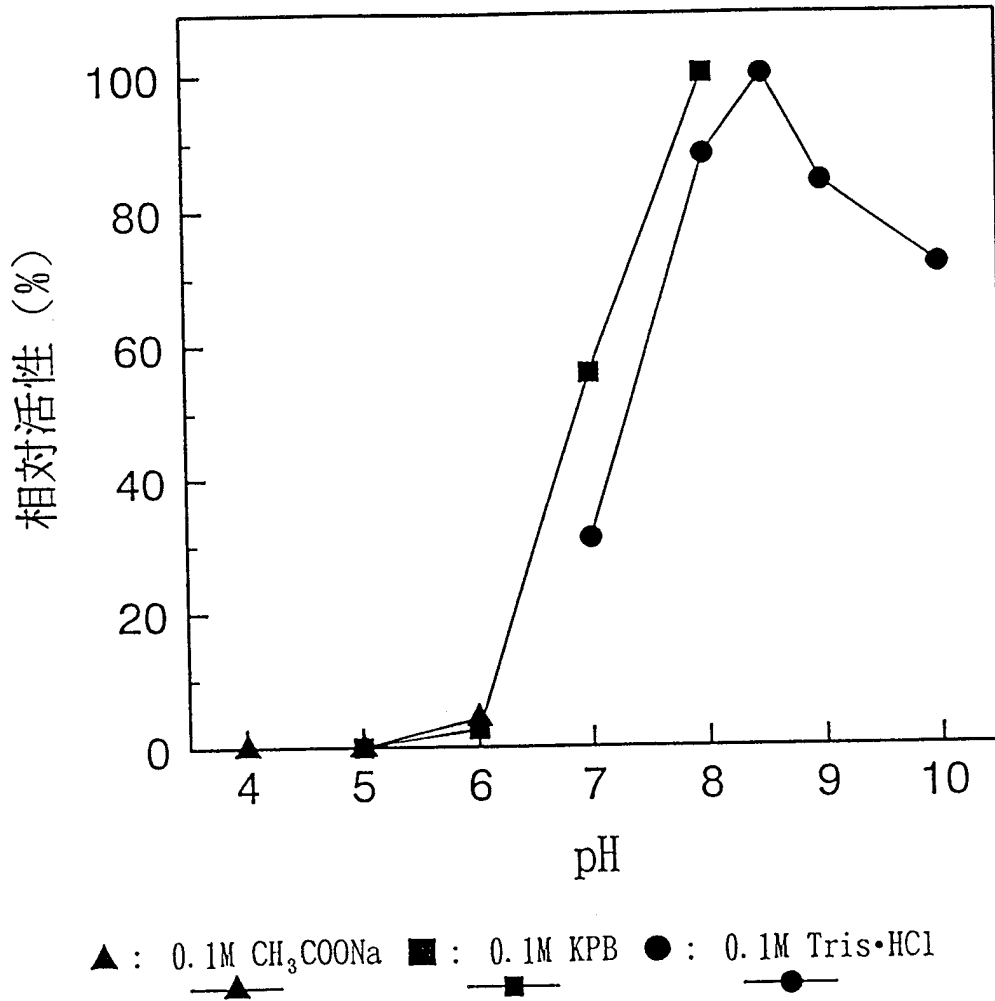
37. 請求項 34～36 いずれか記載の形質転換体を培養もしくは育種することによって、培養に用いた培養液又は該形質転換体より立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを採取することを特徴とする、立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドの製造方法。

38. トランスアミナーゼとして、請求項 37 記載の製造方法により得られる立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドを用いる請求項 1～19 いずれか記載の製造方法。

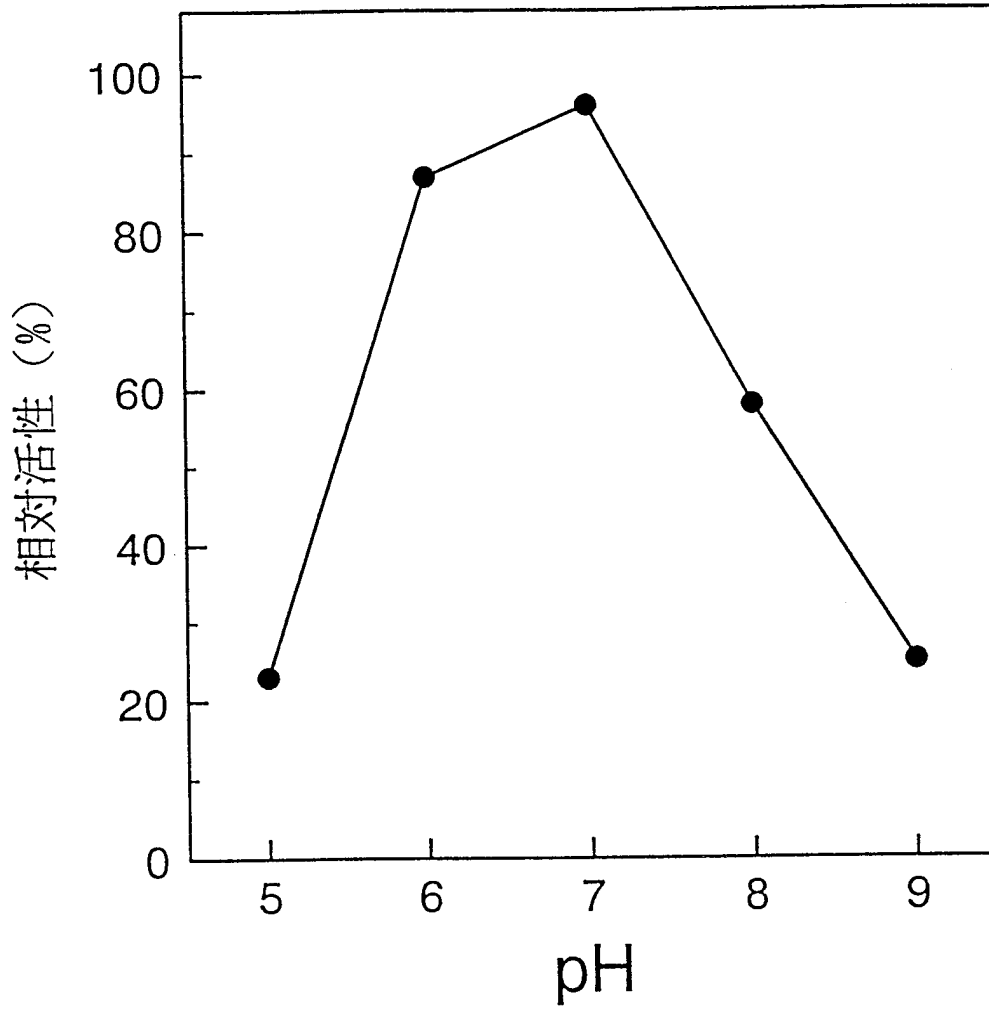
39. 配列番号：2に記載した塩基配列を有するDNAの全部あるいは一部分と、又は該DNAの相補鎖の全部あるいは一部分と、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAであって、かつ立体選択的なトランスアミナーゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA。

40. 請求項20～25いずれか記載のDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズする、プローブ又はプライマーとして用いることができるオリゴヌクレオチド。

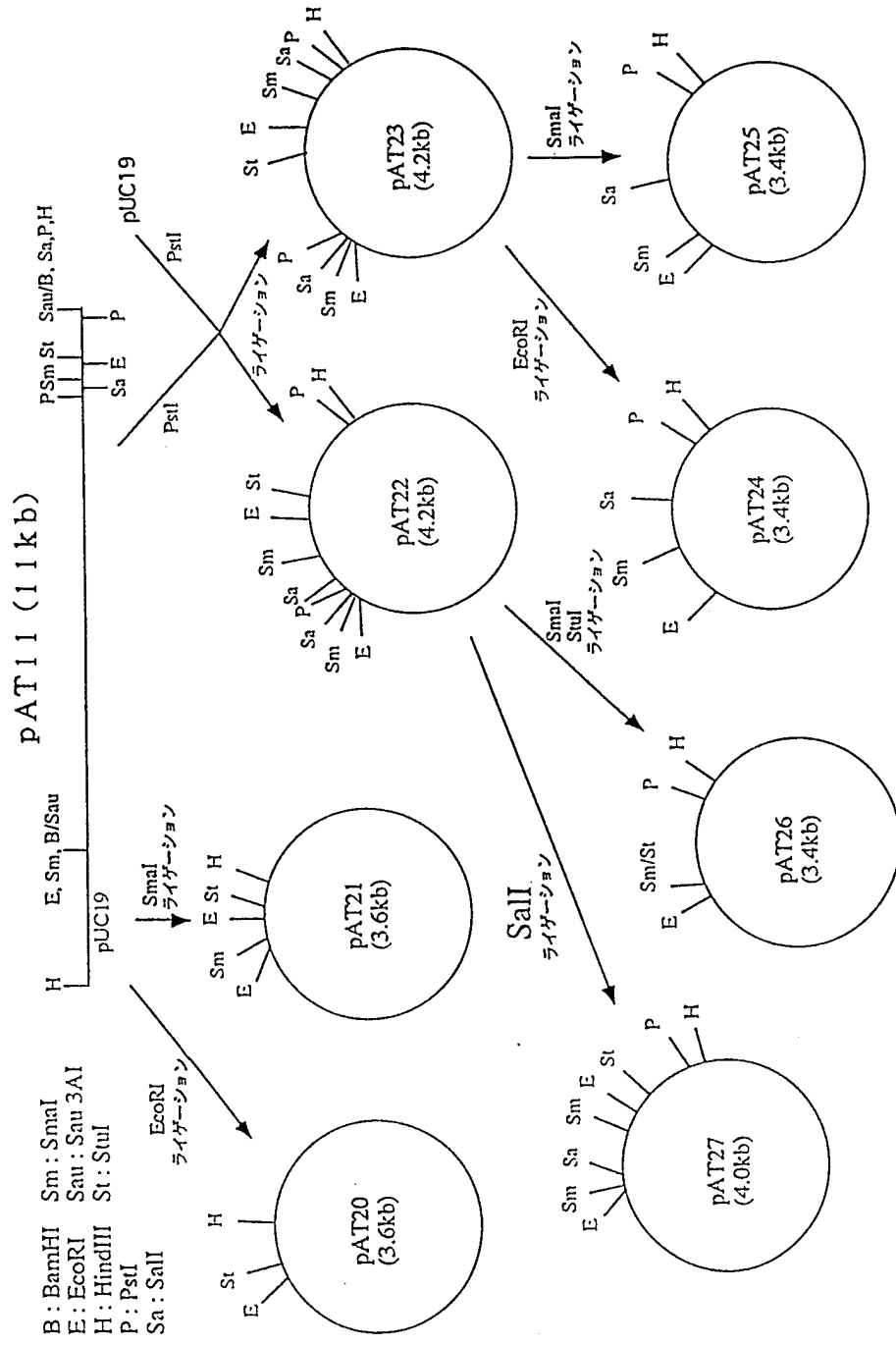
第 1 図



第 2 図



第 3 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12P13/04, C12N15/54 // (C12P13/04, C12R1:06)
(C12N15/54, C12R1:19)

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.Cl⁶ C12P13/00-13/24, C12N15/54

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)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	JP, 62-205790, A (Daicel Chemical Industries, Ltd.), September 10, 1987 (10. 09. 87)	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
X A	JP, 1-285193, A (Daicel Chemical Industries, Ltd.), November 16, 1989 (16. 11. 89)	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
X A	JP, 3-210189, A (E.R. Squibb & Sons, Inc.), September 13, 1991 (13. 09. 91)	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
X A	JP, 61-181392, A (G.D. Searle & Co.), August 14, 1986 (14. 08. 86) & EP, 189938, A1	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
A	JP, 3-103192, A (Celgene Corp.), April 30, 1991 (30. 04. 91) & US, 4950606, A & EP, 404146, A2	1-40

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
July 13, 1998 (13. 07. 98)

Date of mailing of the international search report
July 21, 1998 (21. 07. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/01814

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 6-165687, A (Hoechst AG.), June 14, 1994 (14. 06. 94) & EP, 581250, A2 & US, 5480786, A	1-40

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12P13/04, C12N15/54// (C12P13/04, C12R1:06)
(C12N15/54, C12R1:19)

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. Cl⁶ C12P13/00-13/24, C12N15/54

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)

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
X A	JP, 62-205790, A (ダイセル化学工業株式会社), 10. 9月. 1987 (10. 09. 87)	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
X A	JP, 1-285193, A (ダイセル化学工業株式会社), 16. 11月. 1989 (16. 11. 89)	1-20, 30-38, 40 21-29, 39

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

13. 07. 98

国際調査報告の発送日

21.07.98

国際調査機関の名称及びあて先

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

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高



4B 8827

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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
X A	JP, 3-210189, A (イー・アール・スクイブ・アンド・ サンズ・インコーポレイテッド) 13. 9月. 1991 (13. 09. 91)	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
X A	JP, 61-181392, A (ジー. デイ. サール アンド コ ンパニー) 14. 8月. 1986 (14. 08. 86) &EP, 189938, A1	1-20, 30-38, 40 21-29, 39
A	JP, 3-103192, A (セルジーン、コーポレーション) 30. 4月. 1991 (30. 04. 91) &US, 4950606, A&EP, 404146, A2	1-40
A	JP, 6-165687, A (ヘキスト・アクチェンゲゼルシャフ ト) 14. 6月. 1994 (14. 06. 94) &EP, 581250, A2&US, 5480786, A	1-40