(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4723778号
(P4723778)
(45)発行日　平成23年7月13日(2011.7.13)　(24)登録日　平成23年4月15日(2011.4.15)

(51)Int.Cl.　　F I
C12P 41/00 (2006.01)　C12P 41/00 A
C12N 15/09 (2006.01)　C12N 15/00 A

請求項の数 4　(全 10 頁)

(21)出願番号　特願2001-511194 (P2001-511194)
(86)(22)出願日　平成12年6月17日 (2000.6.17)
(65)公表番号　特表2003-505031 (P2003-505031A)
(43)公表日　平成15年2月12日 (2003.2.12)
(86)国際出願番号　PCT/EP2000/005586
(87)国際公開番号　WO2001/005982
(87)国際公開日　平成13年1月25日 (2001.1.25)
審査請求日　平成19年5月17日 (2007.5.17)
(31)優先権主張番号　199 33 362.9
(32)優先日　平成11年7月20日 (1999.7.20)
(33)優先権主張国　ドイツ(DE)

(73)特許権者　302063961
バイエル・クロツプサイエンス・アクチエンゲゼルシヤフト
ドイツ４０７８９モンハイム・アルフレート－ノベル－シユトラーセ５０
(74)代理人　100091731
弁理士　高木　千嘉
(74)代理人　100127926
弁理士　結田　純次
(74)代理人　100105290
弁理士　三輪　昭次
(74)代理人　100080355
弁理士　西村　公佑

最終頁に続く

(54)【発明の名称】単離されたリコンビナント酵素による酵素的ラセミ体分割によりラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ，Ｌ誘導体からＬ－アミノ酸を製造する方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）ステノトロホモナスsp.（Stenotrophomonas sp.）由来の、単離されたリコンビナントヒプレートヒドロラーゼｄｅａｃ１による酵素的分割によって、Ｎ－アセチル－Ｄ－ホスフィノスリシンは脱アセチルすることなく、Ｎ－アセチル－Ｌ－ホスフィノスリシンを選択的に脱アセチルし、そして
（ｂ）脱アセチルされていないＮ－アセチル－Ｄ－ホスフィノスリシンおよび／または不完全に脱アセチルされたＮ－アセチル－Ｌ－ホスフィノスリシンからこの予備調製された脱アセチルＬ－ホスフィノスリシンを分離すること
からなり、
ここで、ラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ，Ｌ－ホスフィノスリシンが５０mMより高く１５００mMまでの濃度で存在し、
そしてここで、５５時間の反応時間の経過後に得られた脱アセチルＬ－ホスフィノスリシンの空時収量が、少なくとも６９ｍｇの脱アセチルＬ－ホスフィノスリシン／ｇバイオキャタリスト／時間である、
Ｌ－ホスフィノスリシンをラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ，Ｌ－ホスフィノスリシンから製造する方法。
【請求項２】
単離されたリコンビナントヒプレートヒドロラーゼｄｅａｃ１が固定された形態で用いられる請求項１に記載の方法。

【請求項３】
反応温度が２５℃から６５℃である請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
Ｌ－ホスフィノスリシンをラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ホスフィノスリシンから鏡像選択的に製造するための請求項１～３のいずれか１項に記載の方法におけるステノトロホモナスsp.（Stenotrophomonas sp.）由来のｄｅａｃ１の使用。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
高純度および高収量分割による非蛋白質構成アミノ酸のＬ－ＰＰＴ（Ｌ－ホスフィノスリシン（phosphinothricin））の製造は、大腸菌（Escherichia coli）由来のペニシリンＧアシラーゼによりフェナセチルホスフィノスリシンを切断することによるものがこれまでに報告されただけである（ＤＥ－Ａ－３０４８６１２）。しかしフェナセチル－ＰＰＴの合成は、Ｎ－Ａｃ－ＰＰＴと比べてさらに複雑で高価である。一方、ペニシリンＧアシラーゼは脂肪族アシルラジカルに対して特異性をもたず、したがってＮ－Ａｃ－ＰＰＴに対しても特異性をもたない。この他に知られているアシラーゼも同様にＮ－Ａｃ－ＰＰＴに対して全く基質特異性をもたないか、または極めて低い基質特異性しかもたず、これまでに前記酵素を精製することなく微生物によるバイオトランスフォーメーションで用いられただけである（例えばＤＥ－Ａ－２９３９２６９で報告されたとおりである）。このような理由のために極めて低い空時収量しか達成できなかった。ＥＰ－Ａ－０３８２１１３には、アシラーゼＩによるＮ－Ａｃ－ＰＰＴカルボン酸エステルのＬ型特異的切断が開示されている。しかしながら、この酵素さえ遊離カルボン酸に対しては特異性をもたず、したがって前記基質の製造においては付加的合成工程としてエステル化が要求される。
【０００２】
ＤＥ－Ａ－１９６５２２８４には、Ｎ－アセチルアミノ酸、好ましくはＮ－アセチルホスフィノスリシン（Ｎ－Ａｃ－ＰＰＴ）に対して特異性を有する微生物のデアセチラーゼの土壌サンプルからの特異的な単離、並びにステノトロホモナス sp.（Stenotrophomonas sp.）およびコマモナス アシドボランス（Comamonas acidovorans）の対応遺伝子のクローニングが記載されている。
【０００３】
配列相同性の発見および基質特異性検査の実施を基に、報告されたデアセチラーゼは、その天然の基質がＮ－ベンゾイルグリシン、芳香族Ｎ－アシル官能基をもつアミノ酸誘導体であるヒプレートヒドロラーゼ（ＥＣ３．５．１．３２）群に属することを示唆することができた。したがって、これらの酵素はまた基質としてＮ－アセチル化アミノ酸、特にＮ－アセチルホスフィノスリシン（これらは脂肪族Ｎ－アシル官能基を有するアミノ酸誘導体である）を許容することができるということは興味深いことであった。ＤＥ－Ａ－２９３９２６９およびＤＥ－Ａ－２７１７４４０では、ラセミ体ホスフィノスリシンの除草作用は、そのＬ型鏡像体（Ｌ－ＰＰＴ）のみから生じることが開示されている。
【０００４】
これに関して、発見されたデアセチラーゼは、もっぱらＮ－アセチル－ＰＰＴのＬ型鏡像体、およびいくつかの蛋白構成アミノ酸のＮ－アセチル誘導体のＬ型鏡像体を高い特異性で切断することは興味深いことであった。したがってこれらの酵素は、例えばＥＰ－Ａ－０３０４０２１、ＤＥ－Ａ－２９３９２６９およびＤＥ－Ａ－３０４８６１２に記載されているように、分割の原理にしたがってラセミ体Ｎ－アセチル誘導体からＬ－アミノ酸、特に除草活性をもつ化合物Ｌ－ホスフィノスリシンを製造するために極めて適している。しかしながら、上記の３つの特許出願の方法の欠点は以下の事実にある：（１）その工業的適切性が低いとされるために低い基質濃度（ＤＥ－Ａ－２９３９２６９の場合では約０．５％）しか用いることができないこと、（２）副反応および以降の精製工程の問題が解決されていないか、または解決に費用がかかるために反応は非単離酵素を用いて実施されること、および（３）高コストの製品製造が必要であること（ＤＥ－Ａ－３０４８６１２の場合）。

【０００５】
本発明の目的は、適当な形態および量で１つまたは２つ以上の新規なデアセチラーゼ（例えばすでにＤＥ－Ａ－１９６５２２８４で性状を決定されたもの）を発現させること、およびこれらの酵素を用いてＬ－ＰＰＴおよびいくつかの蛋白構成Ｌ－アミノ酸を、化学的に極めてアクセス可能なラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－誘導体から高純度および高鏡像体純度分割によって製造することを可能にすることである。
【０００６】
酵素の作用が既にほぼ判明し、さらに前記酵素をコードする核酸配列のクローニングが既に実施されている場合、最初の操作は、適当な細菌株で過剰産生を実施するために、および／または過剰発現後に蛋白質を単離するために適当な核酸フラグメントを適当なベクターに移すことである。このようにして単離された酵素は、直接酵素反応に用いるか、または適当なカップリング基によってマトリックスに結合させることができる。
【０００７】
所望の反応が進行しているかに関して一般的な確認を得るために、最初の酵素試験が推奨される。以降の工程は全て、反応特異性（出発物質および生成物を基準にして）、反応速度、反応効率、使用酵素の半減期、および可能な基質濃度に関するパラメーターの最適化に適している。個々のパラメーターが要件に体して正確に一致していない場合には、酵素をコードする核酸配列に適当な変更を実施することが可能で、それによって存在する天然の酵素の更なる最適化を得ることができる。
【０００８】
使用される個々のデアセチラーゼのクローニングはＤＥ－Ａ－１９６５２２８４に既に記載されている。 適当なデアセチラーゼをコードする核酸フラグメントは、したがって必要な程度の明確な基質特異性および副反応の排除を担保するために、下記実施例１でさらに実施されるように適当な発現ベクターで再度クローニングされた。したがって、ＤＥ－Ａ－１９６５２２８４ではＮ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴの脱アセチルを示すことは可能であったが、Ｎ－アセチル－Ｄ－ＰＰＴの脱アセチルを示すことはできなかった。一方、Ｎ－アセチル－Ｌ－アミノ酸およびＮ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴの独占的反応は、本明細書で意図される工業的使用のための基本的な必須要件である。
【０００９】
本発明は、蛋白質構成または非蛋白質構成Ｌ－アミノ酸をそれらのラセミ体Ｎ－アセチルＤ,Ｌ－誘導体から製造する方法に関するもので、
(ａ) 単離されたリコンビナント酵素による酵素的分割により対応するＤ－アミノ酸のＮ－アセチル－Ｄ－誘導体は脱アセチルすることなく対応するＬ－アミノ酸のＮ－アセチル－Ｌ－誘導体を選択的に脱アセチルし、そして
(ｂ) 脱アセチルされていないＮ－アセチル－Ｄ－誘導体および／または不完全に脱アセチルされたＮ－アセチル－Ｌ－誘導体からこの予備調製された脱アセチルＬ－アミノ酸を分離すること
からなるものである。
【００１０】
本発明は、単離されたリコンビナント酵素を用いて酵素的分割により、特にＬ－ホスフィノスリシン（Ｌ－ＰＰＴ）をＮ－アセチルＤ,Ｌ－ホスフィノスリシンから製造する方法に関する。
本発明はさらに、酵素分割によりＬ－グルタミン酸、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－グルタミンおよび／またはＬ－フェニルアラニンをそれらの対応するＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体から製造する方法に関する。
【００１１】
本発明はさらに、ヒプレートヒドロラーゼ類から成る群の１つまたは２つ以上のデアセチラーゼを用いて、１つまたは２つ以上のＬ－アミノ酸をそれらの対応するラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体から鏡像選択的に製造すること、特にＬ－ホスフィノスリシン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－グルタミンおよび／またはＬ－フ

ェニルアラニンをヒプレートヒドロラーゼ類から成る群からの１つまたは２つ以上のデアセチラーゼを用いて、それらの対応するラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体から鏡像選択的に製造することを含む製造方法に関する。

【００１２】

特に、本発明は、ステノトロフォモナス sp.（Stenotrophomonas sp.）由来の酵素ｄｅａｃ１および／またはコマモナス アシドボランス（Comamonas acidovorans）由来の酵素ｄｅａｃ２（両デアセチラーゼはＤＥ－Ａ－１９６５２２８４に開示されている）を用いて１つまたは２つ以上のＬ－アミノ酸をそれらの対応するラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体から鏡像選択的に製造すること、さらにこの場合は特に、Ｌ－ホスフィノスリシン、Ｌ－グルタミン酸、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－グルタミンおよび／またはＬ－フェニルアラニンをステノトロフォモナス sp.（Stenotrophomonas sp.）由来の酵素ｄｅａｃ１および／またはコマモナス アシドボランス（Comamonas acidovorans）由来の酵素ｄｅａｃ２（両デアセチラーゼはＤＥ－Ａ－１９６５２２８４に開示されている）を用いて、それらの対応するラセミ体Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体から鏡像選択的に製造することを含む製造方法に関する。両酵素は顕著な配列相同性（これは、Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体の切断において同一または少なくとも類似の機能をもたらす）を有する。

【００１３】

さらに本発明は、高い基質濃度の使用、および／または高い空時収量を達成できる適当な反応の実施を可能にする生物触媒として産生されたリコンビナントデアセチラーゼの使用、特に固定された形のリコンビナントデアセチラーゼの使用に関する。

本発明はさらに、約２５℃から６５℃の反応温度、好ましくは約３５℃から４０℃の反応温度で上記の方法を実施することに関する。

さらに本発明は、約１０mMから１５００mMの基質濃度、好ましくは５０mMより高い基質濃度、特に好ましくは２５０mMより高い基質濃度、極めて好ましくは５００mMより高い基質濃度で上記の方法を実施することに関する。

【００１４】

本発明はさらに、上記の工程によって産生されたＬ－アミノ酸またはＬ－ＰＴＣを対応するＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体から分離することに関する（このとき、前記誘導体は反応を示さないか（Ｎ－アセチル－Ｄ誘導体の場合）、または完全には反応を示さない（Ｎ－アセチル－Ｌ誘導体の場合））。

【００１５】

前記に関して利用可能な方法は、酸性イオン交換体でのイオン交換クロマトグラフィーを用いるか、そうでなければ、有機溶媒（例えばメチルイソブチルケトンのようなもの）を用いてＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ誘導体を抽出し、上記のように製造されたＬ－アミノ酸またはＬ－ＰＴＣを水層に通し、前記水層から乾燥によって濃縮するものである。

【００１６】

【実施例】

１．リコンビナント蛋白質として酵素ｄｅａｃを大腸菌（Escherichia coli）で製造する：

Ｎ－Ａｃ－ＰＰＴ特異的デアセチラーゼをコードするステノトロホモナス sp.（Stenotrophomonas sp.）のｄｅａｃ１の構造遺伝子を１.４kbのＢａｍＨＩ／ＳａｌＩフラグメント（ＤＥ－Ａ－１９６５２２８４に記載）としてキアゲン（Quiagen）のＨｉｓＴａｇ発現ベクターｐＱＥ３０（Quiaexpress Kit, Type IV, カタログ番号32149; Stueber et al.(1990), “Immunological Methods", I. Lefkovits & B. Pernis eds., Vol. IV, Academic Press, New York, pp.121-152）のＢａｍＨＩ／ＳａｌＩ切断部位でクローニングした。

【００１７】

全ての分子生物学的実験は例えば下記に記載されている標準的プロトコルにしたがって実施した：Ausubel et al.(1995), Current protocols in molecular biology, John Wiley & Sons, New York。再連結した構築物を製造元（Quiagen）推奨の細菌株E. coli M15で形質転換し、リコンビナントクローンを１００μg／mlのアンピシリンおよび２５μg／ml

のカナマイシンで選別した。リコンビナント融合蛋白質を１mMのＩＰＴＧの添加によって誘発した。細胞を誘発後４－５時間で採集し、蛋白質操作まで－２０℃で保存した。

【００１８】

誘発クローンの細胞部分標本のＳＤＳ／ポリアクリルアミド電気泳動によって、ＨｉｓＴａｇ・ｄｅａｃ１融合蛋白質を４９ｋＤａのまた別のバンドとして検出できた。このデアセチラーゼ融合蛋白質の酵素活性は、基質として［^{14}Ｃ］－Ｎ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴを用いて放射能アッセイで検出した。そのために、各々２００μLの誘発培養を０.５％トルエン、０.５エタノールで３０分３７℃で透過性にした。続いて細胞ペレットを各々２５μLの０.１mM［^{14}Ｃ］－Ｎ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴ、１０mMのＮａＣｌ、１０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ７.５）に再懸濁し、３７℃で１時間インキュベートした。生成された［^{14}Ｃ］Ｌ－ＰＰＴの定性的測定のために、検査バッチの部分標本の各々５μLを、溶出液としてｎ－プロパノール：２５％アンモニア＝３：２を用いてＨＰＴＬＣセルロースプレート（Merck）上薄層クロマトグラフィーにより分析した。放射能バンドはオートラジオグラフィーによってＸ線フィルムで可視化させた。

【００１９】

酵素反応の定量化のためには、スフェリソーブ（Spherisorb）（登録商標）ＳＡＸを分離用カラムとして用い（溶出液：５mMのKH_2PO_4、１０％メタノール、ｐＨ＝１.９２；流速：０.５mL／分）、放射能ＨＰＬＣで測定した。このような条件下では、［^{14}Ｃ］－Ｌ－ＰＰＴは４.５分で溶出し、［^{14}Ｃ］－Ｎ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴは６.５分で溶出した。

最も高いＮ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴ特異的デアセチラーゼ活性をもつ発現クローンは、半定量的測定によれば総蛋白質に対して約１０％の割合のデアセチラーゼ蛋白質を産生した。これを下記のように酵素の精製およびバイオトランスフォーメーションに用いた。

【００２０】

２．アフィニティークロマトグラフィーによるデアセチラーゼの精製：

実施例１に記載したクローニングにしたがって新規に命名した発現株ｐＱＥＤＥＡＣから、キアゲン（Quiagen）プロトコルにしたがって、自然条件下でニッケルニトリロトリアセテート（Ｎｉ－ＮＴＡ）上でアフィニティークロマトグラフィーによってデアセチラーゼ蛋白質を単離した。この場合、発現株ｐＱＥＤＥＡＣの８００mL培養を発酵培養し、実施例１の記載のように誘発した。採集細胞ペレット（４ｇ）を２０mLの溶解緩衝液に再懸濁し、超音波を用いて破壊した。遠心後、ＨｉｓＴａｇ融合蛋白質の結合のために清澄な蛋白質溶解液（総蛋白質１２０mg）を５０％濃度のＮｉ－ＮＴＡ分散液４mLで処理し、この物質を酵素カラムにロードした。アフィニティーマトリックスを１０容の洗浄緩衝液で洗浄し、続いて４mLの溶出緩衝液で溶出させた。アフィニティー精製をチェックするために、細胞破壊物部分標本、洗浄溶液部分標本および溶出液部分標本を、ＳＤＳ／ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分析した。種々の蛋白質含有分画のデアセチラーゼ活性を実施例１に記載した放射能アッセイを用いて測定した（反応バッチ：９μLの蛋白質溶液＋１μLの１mM［^{14}Ｃ］－Ｎ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴ、反応条件：上記参照）。定性的酵素測定のためには、蛋白質分画を３７℃で５０mMのＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴとともに（９μLの蛋白質溶液＋１μLの５００mMのＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ）インキュベートした。続いて生じたＰＰＴをアミノ酸分析装置（Biotropic LC5001）で測定した。

【００２１】

細胞破壊後の粗抽出物中の蛋白質は、３ncat／mg蛋白質のデアセチラーゼ比活性を有していた（１ncat＝１nmol基質／秒）。発現株培養８００mLから、アフィニティークロマトグラフィーによって１０mgのＨｉｓＴａｇ・ｄｅａｃ融合蛋白質（比活性は２０ncat／mg蛋白質、純度は約８０％）を単離できた。

【００２２】

３．デアセチラーゼの基質特異性および立体選択性：

ｄｅａｃ１蛋白質の基質特異性および立体特異性の解明のために、精製酵素各５μLを２０μLのバッチ（１０mMのＮａＣｌ、１０mMリン酸ナトリウム（ｐＨ＝７.５））中で、表

１に示したＮ－アセチル－Ｌ－アミノ酸または対応するＤ－鏡像体の各々２５mMとともにインキュベートした。比較のために、馬尿酸（Ｎ－ベンゾイルグリシン）（デアセチラーゼの天然の基質）を用いた。反応物を３７℃で１時間インキュベートし、続いてアミノ酸分析装置（Biotronic LC5001）で遊離アミノ酸の生成について測定した。表１は、種々の基質のＬ－鏡像体に対する相対的デアセチラーゼ活性を示す。馬尿酸およびＮ－Ａｃ－Ｌ－ＰＰＴの他に、ｄｅａｃ１酵素はまた多数の天然アミノ酸のＮ－アセチル誘導体、特にＮ－Ａｃ－Ｌ－グルタミン酸、Ｎ－Ａｃ－グリシン、Ｎ－Ａｃ－Ｌ－ヒスチジン、Ｎ－Ａｃ－Ｌ－オルニチン、Ｎ－Ａｃ－Ｌ－ロイシン、Ｎ－Ａｃ－Ｌ－グルタミンおよびＮ－Ａｃ－Ｌ－フェニルアラニンを切断する。全ての事例で、この酵素はＬ－鏡像体に対してもっぱら活性を有し、一方、いずれの場合においても対応するＤ－化合物とは反応できなかった。調べた全てのその他の事例（表１参照）で、Ｎ－アセチル－Ｌ誘導体の反応は非常にわずかな程度しか起こらないか、そうでなければ全く発生しなかった。

【００２３】

【表１】

表１：ｄｅａｃ酵素の基質特異性

基　　質[1]	相対活性[2]（%）
馬尿酸（Ｎ－ベンゾイルグリシン）	１００
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－ホスフィノスリシン	４３
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－オルニチン	３７
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－メチオニン	０
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－トリプトファン	０.４
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－フェニルアラニン	２４
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－チロシン	１１
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－グルタミン酸	１００
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－グルタミン	３０
Ｎ－Ａｃ－グリシン	５９
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－ヒスチジン	４３
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－ロイシン	３３
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－バリン	２
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－セリン	４
Ｎ－Ａｃ－Ｌ－プロリン	０

[1]：全ての化合物はＬ－鏡像体である。

[2]：馬尿酸を用いて測定された比活性（nmolグリシン／分／mg蛋白質）を１００％に設定し、その他の値はそれを基準にした。

【００２４】

４．ｄｅａｃ産生株の細胞を用いるバイオトランスフォーメーションによるＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ホスフィノスリシンの分割：

発現株ｐＱＥＤＥＡＣの４００mL培養を発酵させ、実施例１で述べたように誘発した。続いて採集細胞を１０mMのＮａＣｌ、１０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ７.５）で洗浄し一

晩凍結乾燥させた。このようにして処理した細胞を高いデアセチラーゼ比活性を維持しながら数週間４℃で保存し、バイオキャタリストとして以下の実験で使用することができた。

２mgの凍結乾燥細胞を種々の濃度の下記基質溶液１mLに再懸濁した：
(１) １０mM Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ 二ナトリウム塩(２.３%)
(２) ５０mM Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ 二ナトリウム塩(１.３%)
(３) １００mM Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ 二ナトリウム塩(２.６%)
(４) ２５０mM Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ 二ナトリウム塩(６.７%)
(５) ５００mM Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ 二ナトリウム塩(１３.３%)

【００２５】

反応緩衝液として、本バッチは１０mMのＮａＣｌ、１０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ８.０）を含み、１００rpmのシェーカー上で３７℃で４８時間インキュベートされた。加水分解反応で生じた遊離ＰＰＴをアミノ酸分析装置（Biotronic LC5001）で測定した。結果は表２にまとめられている。反応生成物の鏡像体純度は、分離カラム、キレックス(Chirex)（登録商標）（Ｄ）ペニシラミン（Phenomenex）を用いてキラルＨＰＬＣによって分析した。用いた溶出液は２mMの$CuSO_4$、１０%メタノールで流速は０.５mL／分であった。検出は２５４nmで測光的に実施した。このような条件下では、Ｌ－ＰＰＴのリファレンス溶液は１７分で溶出し、Ｄ－ＰＰＴのリファレンス溶液は２１分で溶出した。全ての検査サンプルで、もっぱらＬ－ＰＰＴが反応生成物として検出された。達成された変換率（産生されたＬ－ＰＰＴ／基質中のＮ－アセチル－Ｌ－ＰＰＴ×１００）は、低基質濃度（１０mM、５０mM）で１００%から最高基質濃度（５００mM）で６６%の間であった。

【００２６】

【表２】

表２：基質濃度の関数としてのＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴの分割

基質溶液（mM） N－アセチル-D,L-PPT	生成物溶液*（mM） L-PPT	変換率（%） L-PPT/N-アセチル-D,L-PPT
１０	５	１００
５０	２５	１００
１００	４８	９６
２５０	１０８	８６
５００	１６４	６６

*：バイオキャタリスト濃度は２mg／mL

【００２７】

以下の実験では、バイオキャタリストの濃度を増加させ、基質切断の反応動態を記録した。１３mgの凍結乾燥細胞を１mLの基質溶液（５００mMのＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ、二ナトリウム塩（１３.３%ｗ／ｖ）、１０mMのＮａＣｌ、１０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ８.０）から成る）に再懸濁し、１００rpmで３７℃でインキュベートした。生成Ｌ－ＰＰＴの測定のために、反応バッチから各々５０μLの部分標本を５５時間にわたって取り出し、遠心して上清を分析まで－２０℃で凍結させた。反応生成物（Ｌ－ＰＰＴ）の定量的分析および鏡像体純度の測定は上記のように実施した。結果は表３にまとめられている。それぞれの選択条件下で、Ｌ型特異的基質切断は約５５時間後に完全であった。この事例では、約９０%の変換率および空時収量４８３（ｍｇＬ－ＰＰＴ／ｇバイオキャタリスト／時間）が達成された。

【００２８】
【表３】

表３：Ｎ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ分割の反応動態

反応時間	Ｌ－ＰＰＴ*（mM）
0	0
1	27.7
4	59.7
9	106.0
23	181.6
31	186.5
47	208.6
55	221.8

*：バイオキャタリストの濃度は１３mg／mL、基質濃度はＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ５００mM

【００２９】
５．精製ｄｅａｃ蛋白質の固定：
単離ｄｅａｃ蛋白質による酵素反応の実施を可能にするために、ＨｉｓＴａｇ融合蛋白質として実施例２で精製した酵素をポリマー担体ＶＩＮＡ－エポキシバイオシンス（VINA-Epoxy Biosynth)（登録商標）（Riedel de Haen）に固定した。そのために、ｄｅａｃ蛋白質を硫安沈殿により１５mg／mLに濃縮し、１Ｍのリン酸ナトリウム（ｐＨ８．０）に対して一晩透析した。標準的カップリング反応のために、１０mgの蛋白質を１００mgのＶＩＮＡ担体とともにゆっくりと室温で２日間振盪した。続いてこの固定物を遠心し、それぞれ１回、固定緩衝液および５０mMリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）で洗浄した。自由なエポキシ基を封鎖するために、続いて担体を５０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）、５０mMの２－メルカプト－エタノールで室温で１時間インキュベートした。バイオキャタリストは、５mMリン酸ナトリウム（ｐＨ７．０）、０．０２％のアジ化ナトリウム１mL中で４℃で保存した。蛋白質カップリングの測定のために、固定の前後に溶液の蛋白質含有量、および洗浄溶液中の蛋白質含有量をブラッドフォード法（Bradford, Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)）を用いて測定した。デアセチラーゼの比活性は、実施例１で述べた放射能アッセイを用いて固定の前後に測定した。カップリング後、溶解蛋白質について測定した相対的酵素活性は＞９０％であった。

【００３０】
６．固定ｄｅａｃ酵素を用いたカラムリアクターでのＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ホスフィノスリシンの分割：
１ｇの酵素固定物（湿潤重量）をカラムリアクターにロードし、種々の流速の種々の濃度の基質溶液を分割するためにバイオキャタリストとして用いた。基質溶液は、１０mMのＮａＣｌ、１０mMのリン酸ナトリウム（ｐＨ８．０）中に表４に示した濃度のＮ－アセチル－Ｄ,Ｌ－ＰＰＴ二アンモニウム塩を含んでいた。反応は３７℃で合計１０日間実施された。反応は、アミノ酸分析およびキラルＨＰＬＣを用い（実施例４を参照されたい）、カラムを通過する物質中に存在するＬ－ＰＰＴの測定によって定量した。結果は表４に示す。８３％の最高変換率が最高の基質濃度（５００mM）および最低基質流量（０．０３mL／

分）で達成された。空時収量は流速および基質濃度とともに増加し、基質濃度５００mMおよび０．３mL／分の流量で最高値１８１（ｍｇＬ－ＰＰＴ／ｇバイオキャタリスト／時間）に達した。全実験期間中、固定デアセチラーゼは良好な安定性を示し、３７℃で１０日経過後にも出発活性の約８０％を維持していた。

【００３１】

【表４】

表４：カラムリアクターに固定されたｄｅａｃ酵素を用いたＮ－アセチル－Ｄ，Ｌ－ＰＰＴの分割

基質溶液 N-Ac-D,L-PPT(mM)	流速 (ml／分)	生成物溶液 L-PPT(mM)	変換率 (%)	空時収量 (mgL-PPT／gバイオキャタリスト／h)*
100	0.1	29.7	59	39
	0.3	22.0	44	87
	0.5	13.8	28	91
250	0.1	38.4	31	50
	0.3	25.0	20	99
	0.5	18.1	14	119
500	0.1	71.1	28	93
	0.3	46.0	18	181
	0.5	26.3	11	173
500	0.03	208.2	83	82

*：３７℃での反応

フロントページの続き

(72)発明者　クラウス・バーチュ
ドイツ連邦共和国デー－６１４６２ケーニヒシュタイン．イム・クラインフェルト５４

審査官　福間　信子

(56)参考文献　国際公開第９８／０２７２０１（WO，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C12P 41/00
CA/BIOSIS/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed