

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2008年4月24日 (24.04.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/047656 A1

- (51) 国際特許分類:
C12P 13/04 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2007/069805
- (22) 国際出願日: 2007年10月11日 (11.10.2007)
- (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 2006-279075
2006年10月12日 (12.10.2006) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 金丸 博幸 (KANAMARU, Hiroyuki) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 上田 真 (UEDA, Makoto) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 難波 弘憲 (NANBA, Hirokazu) [JP/JP]; 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 共通の代表者: 株式会社カネカ (KANEKA CORPORATION); 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島三丁目2番4号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (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
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(54) Title: METHOD FOR PRODUCTION OF L-AMINO ACID

(54) 発明の名称: L-アミノ酸の製造方法

(57) Abstract: Disclosed is a method for producing an L-amino acid, which comprises the step of reacting a keto acid with an amino acid dehydrogenase and an enzyme capable of regenerating a coenzyme to convert the keto acid into an L-amino acid, wherein the coenzyme is added to the reaction in two or more divided portions. The method enables to produce an optically highly pure L-amino acid which is a compound useful as an intermediate for the synthesis of a pharmaceutical agent or the like, by an enzymatic reductive amination with a high degree of efficiency, regardless of the purity of the keto acid to be used as a substrate.

(57) 要約: 本発明は、ケト酸に、アミノ酸脱水素酵素及び補酵素再生能を有する酵素を作用させてL-アミノ酸に変換する反応において、補酵素を2回以上に分割して反応に添加することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法である。本発明の方法によれば、基質であるケト酸の純度にかかわらず、酵素的還元アミノ化反応によって、医薬品等の合成中間体として有用な化合物である高光学純度のL-アミノ酸を効率良く製造することができる。



WO 2008/047656 A1

明 細 書

L-アミノ酸の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、医薬品等の中間体として有用な、L-アミノ酸の製造法に関する。より詳細には、対応するケト酸に、アミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素を作用させてL-アミノ酸に変換する反応において、補酵素を2回以上に分割して添加することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法に関する。

背景技術

[0002] L-アミノ酸は医薬品等の合成中間体として有用な化合物である。L-アミノ酸の製造方法としては、抽出法、化学合成法、発酵法、酵素的合成法など種々の方法が知られている。抽出法では蛋白質加水分解物からの大規模な精製設備が必要となる。化学合成法で製造されるアミノ酸は通常ラセミ体であるため、光学活性体を製造するには、高価な分割剤、不斉触媒等を必要とする。発酵法では生成物濃度が低く、抽出法同様大規模な精製設備を必要とし、また、非天然型のアミノ酸の合成には適していない。酵素的合成法は安価な生体触媒を利用することにより、これらの問題点を回避して、より低コストで効率のよい製造方法を提供可能である。L-アミノ酸の酵素的合成法としては、例えば対応するケト酸にアミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素を作用させてL-アミノ酸を製造する方法(非特許文献1)が知られている。しかし、上記の方法では、高価な市販酵素や微生物から精製された酵素を使用する必要があり、工業的に使用するには課題を抱えていた。

[0003] このような課題を解決するための手段として、これらの酵素をコードするDNAを遺伝子組換え手法を用いてクローン化して形質転換体を育種し、該形質転換体を培養することにより、各酵素を高生産する試みがなされている。例えば、補酵素依存性アミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生酵素をコードする各遺伝子を有する形質転換体を育種、培養し、ケト酸に作用させてL-アミノ酸を製造する方法が知られている(特許文献1、2)。しかし上記特許文献1に記載されている反応により生成するL-アミノ酸の濃度は約10mMと工業的に製造を行なうには低い濃度である。また、特許文献

2に記載されている方法では、ケト酸を分割、あるいは連続的に添加することにより反応液中のケト酸の濃度を一定値以下に保つ必要がある。

特許文献1:特開平10-23896号公報

特許文献2:国際公開第WO95/093081号パンフレット

非特許文献1:ラメシュ・N・パテル(Ramesh N. Patel)、「抗高血圧薬オマパトリラットの光学活性中間体の酵素的合成」(Enzymatic synthesis of chiral intermediates for Omapatrilat, an antihypertensive drug)、バイオモレキュラー・エンジニアリング(Biomolecular Engineering)、2001年、17号、167頁

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明者らは還元アミノ化反応において、純度の低いケト酸を基質として使用すると、反応の生産性が低下する場合があることを見出した。

[0005] 本発明の目的は、上記還元アミノ化反応において基質の純度にかかわらず効率的なL-アミノ酸の製造方法を提供することにある。

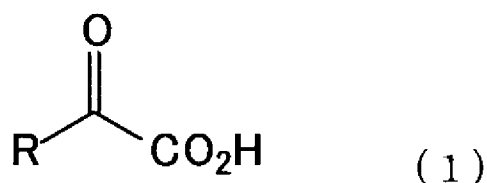
課題を解決するための手段

[0006] 本発明者らは上記課題に鑑み、鋭意研究した結果、対応するケト酸にアミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素を作用させることによりL-アミノ酸に変換する反応(還元アミノ化反応)を行う際に、反応液中に補酵素を2回以上に分けて添加することにより、低純度のケト酸を基質として使用した場合に生じるL-アミノ酸の収率低下等による生産性の低下を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0007] すなわち本発明は、以下の特徴を有する。

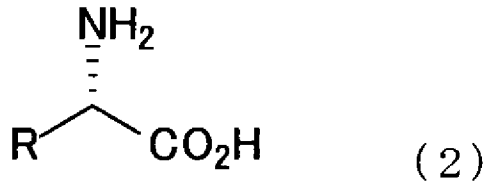
本発明の一つの特徴は、一般式(1)：

[0008] [化3]



(式中、Rは置換基を有していてもよい炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数7～20のアラルキル基、もしくは置換基を有していてもよい炭素数6～20のアリール基を表す。)で表されるケト酸に、アミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素を作用させて、一般式(2)：

[0009] [化4]



(式中、Rは前記と同じ)で表されるL-アミノ酸に変換する反応において、補酵素を2回以上に分割して反応に添加することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法である。

[0010] また、本発明の一つの特徴は、ケト酸の純度が95%以下である上記L-アミノ酸の製造方法である。

[0011] また、本発明の一つの特徴は、反応開始時における補酵素の添加量が、反応を通じての総添加量の4分の3以下である上記L-アミノ酸の製造方法である。

[0012] また、本発明の一つの特徴は、1回の補酵素の添加量が、反応を通じての総添加量の2分の1以下である上記L-アミノ酸の製造方法である。

[0013] また、本発明の一つの特徴は、補酵素を連続的に添加する上記L-アミノ酸の製造方法である。

発明の効果

[0014] 本発明は上述の構成からなり、基質であるケト酸の純度にかかわらずL-アミノ酸を効率良く製造することができる。

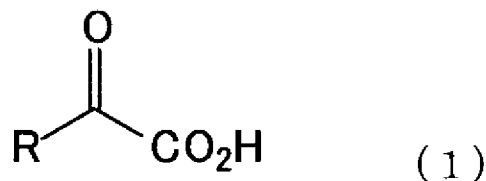
発明を実施するための最良の形態

[0015] 以下、実施形態に基づいて本発明を詳細に説明する。本発明の範囲は、実施形態および実施例によって限定されるものではない。

[0016] 1. 還元アミノ化反応に基質として使用するケト酸の種類

本発明の還元アミノ化反応の基質としては、以下の一般式(1)：

[0017] [化5]



で表される(式中、Rは置換基を有していてもよい炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数7～20のアラルキル基、もしくは置換基を有していてもよい炭素数6～20のアリール基を表す。)で表されるケト酸を挙げることができる。

[0018] 上記Rにおける置換基を有していてもよい炭素数1～20のアルキル基としては、特に限定されず、例えば、メチル基、イソプロピル基、イソブチル基、1-メチルプロピル基、カルバモイルメチル基、2-カルバモイルエチル基、ヒドロキシメチル基、1-ヒドロキシエチル基、メルカプトメチル基、2-メチルチオエチル基、(1-メルカプト-1-メチル)エチル基、4-アミノブチル基、3-グアニジノプロピル基、4(5)-イミダゾールメチル基、エチル基、n-プロピル基、n-ブチル基、t-ブチル基、2,2-ジメチルプロピル基、クロロメチル基、メトキシメチル基、2-ヒドロキシエチル基、3-アミノプロピル基、2-シアノエチル基、3-シアノプロピル基、4-(ベンゾイルアミノ)ブチル基、又は、2-メトキシカルボニルエチル基などが挙げられる。

[0019] 置換基を有していてもよい炭素数7～20のアラルキル基としては、特に限定されず、例えば、ベンジル基、インドリルメチル基、4-ヒドロキシベンジル基、2-フルオロベンジル基、3-フルオロベンジル基、4-フルオロベンジル基、又は、3,4-メチレンジオキシベンジル基等が挙げられる。

[0020] 置換基を有していてもよい炭素数6～20のアリール基としては、フェニル基、または4-ヒドロキシフェニル基などが挙げられる。

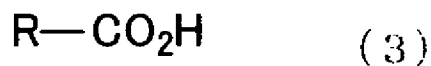
[0021] 置換基としては、アミノ基、ヒドロキシル基、ニトロ基、シアノ基、カルボキシル基、アルキル基、アラルキル基、アリール基、アルカノイル基、アルケニル基、アルキニル基、アルコキシル基、又はハロゲン原子等が挙げられる。

[0022] また、上記ケト酸には、該ケト酸を製造する際の副産物、該ケト酸の分解物等の不純物が混入している場合がある。不純物としては例えば、塩酸、硫酸等の鉱酸;ギ酸

、酢酸等の有機酸；ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム、鉄、リチウム、マンガ、亜鉛、銅等の金属及びそれらの塩；メタノール、エタノール、酢酸エチル、アセトン、トルエン、クロロホルム、n-ヘキサン等の有機溶媒等を挙げる事ができる。

[0023] また、分解物としては例えば、当該ケト酸が脱炭酸することにより生成する一般式(3)：

[0024] [化6]



(式中、Rは前記と同じ)で表されるカルボン酸化合物等を挙げる事ができる。

[0025] このような不純物の混入により純度が低下したケト酸を、後述する還元アミノ化反応の基質として使用すると、反応の生産性が低下する場合がある(参考例1、及び比較例1を参照)。反応の生産性が低下する例としては、生成するL-アミノ酸の収率が低下する、反応時間が増加する事等が挙げられる。

[0026] ここで述べるケト酸の純度とは、該ケト酸製品の乾燥重量に対する該ケト酸製品中に含まれるケト酸の重量の割合を示す。

[0027] 2. 還元アミノ化反応に使用する酵素

次に還元アミノ化反応に使用する酵素について説明する。アミノ酸脱水素酵素とは、ケト酸又は環状イミンを還元的にアミノ化する活性を有する酵素であり、例えばフェニルアラニン脱水素酵素、ロイシン脱水素酵素、ピロリン-2-カルボン酸レダクターゼ等を挙げる事ができる。

[0028] これらアミノ酸脱水素酵素による反応は、NADHのような還元型の補酵素を必要とし、当該反応の進行に伴い、補酵素NADHは酸化型に変換される。この酸化型の補酵素を還元型に変換する能力(以後、補酵素再生能と呼ぶ)を有する酵素、及び当該補酵素再生能を有する酵素の基質となる化合物を、アミノ酸脱水素酵素と共存させて反応を行うことにより、補酵素の使用量を大幅に削減できる。

[0029] 補酵素再生能を有する酵素としては、例えば、ヒドロゲナーゼ、ギ酸脱水素酵素、アルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素

、又はグルコース脱水素酵素等を挙げるができる。好適には、ギ酸脱水素酵素が使用される。

- [0030] 本発明で用いるアミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素としては、動物、植物、微生物由来のものが使用できるが、工業的な利用には微生物由来のものが好ましい。
- [0031] アミノ酸脱水素酵素の生産能力を有する微生物としては、例えば、以下の公知の当該酵素の生産能力を有する微生物である、ブレヴィバクテリウム (Brevibacterium) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、スポロサルシナ (Sporosarcina) 属、サーモアクチノマイセス (Thermoactinomyces) 属、マイクロバクテリウム (Microbacterium) 属、ハルモナス (Halomonas) 属、クロストリジウム (Clostridium) 属、バチルス (Bacillus) 属、ニューロスポラ (Neurospora) 属、エシェリヒア (Escherichia) 属、又は、アエロバクター (Aerobacter) 属に属する微生物等が挙げられる。
- [0032] 好ましくはバチルス (Bacillus) 属に属する微生物由来の酵素が挙げられる。さらに好ましくは、バチルス バディウス (Bacillus badius) IAM11059、又は、バチルス スファエリカス (Bacillus sphaericus) NBRC3341由来の酵素が挙げられる。
- [0033] バチルス バディウス (Bacillus badius) IAM11059はフェニルアラニン脱水素酵素を生産する微生物であり、EP256514号、及びBisci. Biotechnol. Biochem. 、1995年、59巻、10号、1994頁で公知である。
- [0034] また、バチルス スファエリカス (Bacillus sphaericus) NBRC3341株は、ロイシン脱水素酵素を生産する微生物であり、公知のバチルス サチルス (Bacillus subtilis) のロイシン脱水素酵素とアミノ酸残基数が同じであり、アミノ酸配列で100%一致する。遺伝子配列では1095塩基中、14塩基が異なっている。
- [0035] バチルス サチルス (Bacillus subtilis) の遺伝子配列は、Nature、1997年、390巻、249頁およびNCBIデータベースのアクセッションナンバーCAB14339で公知である。また、ピロリン-2-カルボン酸レダクターゼがニューロスポラ (Neurospora) 属、エシェリヒア (Escherichia) 属、アエロバクター (Aerobacter) 属で知られていることは、Methods Enzymol. 、1962年、5巻、882頁で述べられている。
- [0036] ギ酸脱水素酵素の生産能力を有する微生物としては、例えば、以下の公知の当該

酵素の生産能力を有する微生物である、キャンディダ (Candida) 属、クロイッケラ (Kloeckera) 属、ピキア (Pichia) 属、リポマイセス (Lipomyces) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、モラキセラ (Moraxella) 属、ハイホマイクロビウム (Hyphomicrobium) 属、パラコッカス (Paracoccus) 属、チオバシラス (Thiobacillus) 属、又は、アンシロバクター (Ancylobacter) 属に属する微生物等が挙げられる。

[0037] 好ましくはチオバシラス (Thiobacillus) 属、又は、アンシロバクター (Ancylobacter) 属に属する微生物由来の酵素が挙げられる。さらに好ましくはチオバシラス エスピー (Thiobacillus sp.) KNK65MA株 (FERM BP-7671)、又は、アンシロバクター アクアティカス (Ancylobacter aquaticus) KNK607M株 (FERM BP-7335) 由来の酵素が挙げられる。

[0038] 上記の各酵素を効率良く高生産する高活性菌を得るためには、周知のとおり、形質転換微生物を作成することが有効である。形質転換微生物の作成方法としては、例えばロイシン脱水素酵素活性を示す菌株からロイシン脱水素酵素遺伝子をクローニングした後、適当なベクターとの組換えプラスミドを作成し、これを用いて、特に限定されないが、エシエリヒア コリ (Escherichia coli) 等の宿主微生物を形質転換することにより形質転換体を得る方法が挙げられる。

[0039] ベクターとしては宿主内で自律複製できる微生物由来のプラスミド、ファージまたはその誘導体を使用できる。なかでも、宿主微生物として、例えば、菌学的性質が当業者に周知であって、形質転換用に提供されているエシエリヒア コリ (Escherichia coli) を選択し、ベクターとして当該微生物中で自律複製できるベクターを用いることが好ましい。

[0040] このようなベクターとしては、例えば、当業者が容易に入手可能、あるいは市販されているpUC18 (タカラバイオ株式会社)、pUC19 (タカラバイオ株式会社)、pBR322 (タカラバイオ株式会社)、pACYC184 (株式会社 ニッポンジーン)、pSTV28 (タカラバイオ株式会社)、pSTV29 (タカラバイオ株式会社)、pSC101 (フナコシ株式会社)、pT7Blue (タカラバイオ株式会社)、又は国際公開第WO94/03613号パンフレットの明細書の記載に基づいて当業者が製造しうるpUCNT、若しくはそれらの誘導体を挙げるができる。

- [0041] それらの誘導体とは、酵素の生産量上昇、プラスミド安定化を目的として、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、SD配列、複製開始部位(ori)、その他の調節などに関わる遺伝子を改質したもの、また、薬剤耐性、クローニング部位の制限酵素サイトを改質したものなどを指す。
- [0042] このようにして得られた形質転換体の一例として、チオバシラス エスピー (Thiobacillus sp.)KNK65MA株 (FERM BP-7671)由来のギ酸脱水素酵素遺伝子を含むエシェリヒア コリ (Escherichia coli) HB101 (pFT001) (FERM BP-7672)、又はエシェリヒア コリ (Escherichia coli) HB101 (pFT002) (FERM BP-7673) (国際公開第WO03/031626号パンフレット参照)等を挙げることができる。
- [0043] なお、本発明で用いた組換えDNA技術は当該分野において周知であり、例えば、Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989)、Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience)に記載されている。
- [0044] 上記形質転換体等を培養することにより当該酵素を大量に生産することができ、L-アミノ酸の製造に利用することができる。微生物の培養は、通常培地を用いて行えば良い。培養に使用する培地としては、炭素源、窒素源および無機塩類などの栄養素を含む通常培地で良い。これに、ビタミン、アミノ酸などの有機微量栄養素を添加すると、好ましい結果が得られる場合が多い。炭素源としては、グルコースやシュークロースのような炭水化物、酢酸のような有機酸、アルコール類などが適宜使用される。窒素源としては、アンモニウム塩、アンモニア水、アンモニアガス、尿素、酵母エキス、ペプトン、コーンステーパーリカーなどが用いられる。無機塩類としてはリン酸塩、マグネシウム塩、カリウム塩、ナトリウム塩、カルシウム塩、鉄塩、硫酸塩、塩素などが用いられる。
- [0045] 培養は温度範囲25°Cから40°Cで行えるが、25°Cから37°Cが特に好ましい。また、pHは4から8で培養できるが5から7.5が好ましい。また、回分式、連続式のいずれの培養方法でもよい。
- [0046] 必要に応じてイソプロピルー1-チオーβ-D-ガラクトサイド (IPTG)、ラクトース等の添加等の酵素誘導のための処理を行なうこともできる。

[0047] 3. 還元アミノ化反応

次に、還元アミノ化反応によるケト酸からのL-アミノ酸の製造方法について説明する。還元アミノ化反応では、ケト酸と前述のアミノ酸脱水素酵素、及び、補酵素再生能を有する酵素とその基質となる化合物を同時に存在させ、水性媒体中で反応を行なう。

[0048] また、本発明において使用するアミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素は、それぞれの活性を有する微生物を培養して生産したものをを用いてもよいし、あるいはそれぞれの酵素遺伝子を導入した形質転換体を育種し、培養して生産したものを使用してもよく、さらに複数の酵素遺伝子を導入した形質転換体を育種し、培養して生産したものを使用してもよい。

[0049] 本発明において、生産されたアミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素は、酵素自体として用いることができるほか、微生物もしくはその処理物としても用いることができる。ここで、微生物の処理物とは、例えば、粗抽出液、培養菌体凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、またはそれらの菌体の破砕物等で目的の酵素活性を有しているものを意味する。

[0050] 更にそれらは、酵素自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化して得た固定化酵素として用いられ得る。固定化は当業者に周知の方法である架橋法、共有結合法、物理的吸着法、包括法などで行い得る。

[0051] 上記還元アミノ化反応にNAD等の補酵素を添加することにより、反応の効率が向上することが期待できる。NAD等の補酵素の添加濃度としては、基質に対して、好ましくは0.000001当量以上、2当量以下、より好ましくは0.00001当量以上、0.1当量以下、さらに好ましくは0.0001当量以上、0.01当量以下である。補酵素添加量の上限は特に制限されないが、経済性の点から、通常は2当量以下、好ましくは0.1当量以下、より好ましくは0.01当量以下である。

[0052] さらに、前項1. で挙げた反応の生産性を低下させる低純度のケト酸を基質とした場合、NAD等の補酵素を2回以上に分けて添加する(分割添加)ことにより、全量を反応開始時に添加(一括添加)した場合に比べて、反応の生産性を向上させることが可能である(実施例1、及び比較例1を参照)。反応の生産性が向上する例としては、生

成するL-アミノ酸の収率が向上する、反応時間が短縮できる事等が挙げられる。上記のような低純度のケト酸を基質として使用し、補酵素を反応開始時に一括添加する場合も、補酵素を多量に添加すれば、反応の生産性を向上させることが可能であるが、分割添加を行うことにより補酵素の総添加量を削減することが可能である。

- [0053] 補酵素を分割添加する場合、反応開始時に添加する補酵素の量としては、反応を通じての総添加量の4分の3以下であることが好ましく、より好ましくは3分の2以下、さらに好ましくは2分の1以下、特に好ましくは3分の1以下、4分の1以下である。
- [0054] また、補酵素を分割添加する場合における一回の添加量としては、反応を通じての総添加量の3分の2以下であることが好ましく、より好ましくは2分の1以下、さらに好ましくは3分の1以下、特に好ましくは4分の1以下である。
- [0055] さらに補酵素を分割添加する場合における、補酵素の添加回数は2回以上が好ましく、より好ましくは3回以上であり、さらに好ましくは4回以上である。また、補酵素は反応中に連続的に添加することも可能である。
- [0056] 上述のような補酵素の分割添加による反応の生産性向上効果は、基質の純度が95%以下の場合に有効であり、90%以下の場合により有効であり、85%以下の場合に特に有効である。
- [0057] 上記還元アミノ化反応の基質であるケト酸の仕込み濃度は0.1% (w/v) 以上、90% (w/v) 以下、好ましくは1% (w/v) 以上、60% (w/v) 以下で溶解または懸濁した状態で反応を行い、反応温度は10°C以上、80°C以下、好ましくは20°C以上、60°C以下の適当な温度で調節し保ちつつ暫時静置または攪拌すればよい。
- [0058] 上記反応のpHは、4以上、12以下で行うのが好ましく、さらに好ましくはpH6以上、11以下である。pHの調整は酸、又は塩基を添加することで行うことができる。
- [0059] 本反応の基質は一括添加してもよいし、分割添加してもよいし、連続的に添加してもよい。上記還元アミノ化反応は、バッチ法または連続方式で行い得る。
- [0060] 本発明の還元アミノ化反応は、固定化酵素、膜リアクターなどを利用して行うことも可能である。水性媒体としては、水、緩衝液、これらにエタノールのような水溶性有機溶媒を含む水性媒体、あるいは、水に溶解しにくい有機溶媒、たとえば、酢酸エチル、酢酸ブチル、トルエン、クロロホルム、n-ヘキサンなどの有機溶媒を含む水性媒体

との二相系などの適当な溶媒を用いることができる。さらに必要に応じて、抗酸化剤、界面活性剤、金属などを添加することもできる。

- [0061] 上記のような還元アミノ化反応により生成したL-アミノ酸の単離は、常套分離方法、例えば、抽出、濃縮、晶析、またはカラムクロマトグラフィーなどの分離方法や、それらの組み合わせにより分離、精製することができる。

実施例

- [0062] 以下に本発明の具体的な実施例を示す。しかし、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

[0063] (比較例1)還元アミノ化反応によるL-tert-ロイシンの合成(補酵素一括添加)

後述する参考例4に示す方法で育種したロイシン脱水素酵素活性及びギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体を、滅菌した培地A(トリプトン1.6%、イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム0.5%、アンピシリン0.01%、脱イオン水に溶解、滅菌前pH7.0、ただしアンピシリンは滅菌後に添加する)に植菌後、33°Cで48時間、振とうして好氣的に培養した。

- [0064] 得られた培養液から遠心分離により菌体を集菌し、脱イオン水に懸濁して、菌体濃縮液を得た。

- [0065] 純度83.2%のトリメチルピルビン酸96.2mgに、上記菌体濃縮液、及びトリメチルピルビン酸の1.4モル当量のギ酸アンモニウムを添加し、さらに5Mアンモニア水を添加してpHを8.0に調整した後、脱イオン水を添加して2mlになるよう反応液を調製した。この反応液にNADをトリメチルピルビン酸の0.0009モル当量となるよう添加して、30°Cで攪拌し、21.5時間反応を行なった。

- [0066] 残存したトリメチルピルビン酸、及び生成したL-tert-ロイシンの収率・光学純度を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて分析したところ、トリメチルピルビン酸の残存率は18.8mol%、L-tert-ロイシンの収率は81.1mol%、L-tert-ロイシンの光学純度は99%e. e. 以上であった。

- [0067] 高純度のトリメチルピルビン酸を使用した場合(参考例1)に比べてL-tert-ロイシンの収率は低下し、トリメチルピルビン酸の残存率は増加した。

- [0068] (トリメチルピルビン酸 HPLC分析条件)

カラム: COSMOSIL 5C18-AR (4.6mm×250mm、ナカライテスク社製)、移動相: 10mMリン酸カリウム緩衝液 (pH2.0) / アセトニトリル = 95 / 5、流速: 1ml / 分、カラム温度: 40°C、検出: 210nm。

[0069] (L-tert-ロイシン HPLC分析条件)

カラム: SUMICHIRAL OA-5000 (4.6mm×250mm、住化分析センター社製)、移動相: 2mM硫酸銅水溶液 / メタノール = 95 / 5、流速: 1ml / 分、カラム温度: 35°C、検出: 254nm。

[0070] (実施例1)還元アミノ化反応によるL-tert-ロイシンの合成(補酵素分割添加)

比較例1で使用した純度83.2%のトリメチルピルビン酸96.2mgに、比較例1と同量のロイシン脱水素酵素活性及びギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体の菌体濃縮液、及びトリメチルピルビン酸の1.4モル当量のギ酸アンモニウムを添加し、さらに5Mアンモニア水を添加してpHを8.0に調整した後、脱イオン水を添加して2mlになるよう反応液を調製した。この反応液にNADをトリメチルピルビン酸の0.0003モル当量となるよう添加して、30°Cで攪拌した。

[0071] 反応開始から3時間目、及び6時間目にそれぞれNADを基質の0.0003モル当量添加して21.5時間目まで反応を行なった。

[0072] 残存したトリメチルピルビン酸、及び生成したL-tert-ロイシンの収率・光学純度を比較例1と同様の方法で分析したところ、トリメチルピルビン酸の残存率は0.4mol%、L-tert-ロイシンの収率は104.3mol%、L-tert-ロイシンの光学純度は99%e. e. 以上であった。

[0073] 補酵素を一括添加した場合(比較例1)に比べてL-tert-ロイシンの収率向上、トリメチルピルビン酸の残存率の減少が認められた。

[0074] (参考例1)還元アミノ化反応によるL-tert-ロイシンの合成

純度98.5%のトリメチルピルビン酸81.2mgに、比較例1と同量のロイシン脱水素酵素活性及びギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体の菌体濃縮液、及びトリメチルピルビン酸の1.4モル当量のギ酸アンモニウムを添加し、さらに5Mアンモニア水を添加してpHを8.0に調整した後、脱イオン水を添加して2mlになるよう反応液を調製した。

- [0075] この反応液にNADを基質の0.0009モル当量となるよう添加して、30°Cで攪拌して22時間目まで反応を行なった。
- [0076] 比較例1と同様の方法で分析したところ、トリメチルピルビン酸は消失し、L-tert-ロイシンが変換率96.4mol%、光学純度99%e. e. 以上で生成していた。
- [0077] (参考例2)ギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体の育種
チオバシラス エスピー (Thiobacillus sp.)KNK65MA株 (FERM BP-7671)のゲノムを鋳型に、DNAプライマー (Primer-1:配列表の配列番号1、及び、Primer-2:配列表の配列番号2)を用いてPCRを行なった。
- [0078] PCRは、鋳型DNA100ngにPyrobestDNAポリメラーゼ (タカラバイオ社製)1.25U (0.25 μ l)、10 \times Pyrobest BufferII (タカラバイオ社製)5 μ l、2.5mM各dNTP溶液4 μ l、20 μ Mプライマー水溶液各2 μ lを添加し、さらに滅菌水を加えて総量が50 μ lになるように調製した反応液を作製し、熱変性 (96°C、30秒)、アニーリング (50°C、30秒)、伸長反応 (72°C、90秒)を25サイクル繰り返した後、4°Cまで冷却することにより行なった。
- [0079] PCRにより得られたDNA断片を制限酵素NdeIとEcoRIで切断し、同酵素で切断したベクタープラスミドpUCNT (国際公開第WO94/03613号パンフレットの明細書の記載に基づいて当業者が製造可能)とT4 DNAリガーゼを用いて結合することで、ギ酸脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドを取得した。
- [0080] 得られたプラスミドをエシエリヒア コリ (Escherichia coli) HB101のコンピテントセルと混合し形質転換を行なうことで、ギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体を育種した。
- [0081] 得られた形質転換体を、試験管内にて滅菌した6mlの培地Aに植菌後、37°Cで24時間、振とうして好氣的に培養した。
- [0082] 得られた培養液から遠心分離により菌体を集菌し、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN社製)を用いてプラスミド抽出を行い、ギ酸脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドを回収した。
- [0083] (参考例3)ロイシン脱水素酵素活性を有する形質転換体の育種
バチルス スファエリカス (Bacillus sphaericus) NBRC3341株のゲノムを鋳型に、D

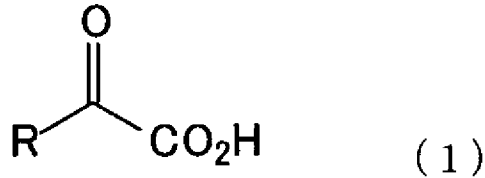
NAプライマー (Primer-3:配列表の配列番号3、及び、Primer-4:配列表の配列番号4)を用いてPCRを行なった。PCRの条件は参考例2と同様にして行なった。

- [0084] PCRにより得られたDNA断片を制限酵素EcoRIとSacIで切断し、同酵素で切断したベクタープラスミドpUCT(pUCNT(国際公開第WO94/03613号パンフレットの明細書の記載に基づいて当業者が製造可能)のNdeI認識配列を一塩基置換により破壊したプラスミドベクター)とT4 DNAリガーゼを用いて結合することで、ロイシン脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドを取得した。
- [0085] 得られたプラスミドをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) HB101のコンピテントセルと混合し形質転換を行なうことで、ロイシン脱水素酵素活性を有する形質転換体を育種した。
- [0086] 得られた形質転換体を、試験管内にて滅菌した6mlの培地Aに植菌後、37°Cで24時間、振とうして好氣的に培養した。
- [0087] 得られた培養液から遠心分離により菌体を集菌し、QIAprep Spin Miniprep Kit(QIAGEN社製)を用いてプラスミド抽出を行い、ロイシン脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドを回収した。
- [0088] (参考例4)ロイシン脱水素酵素活性及びギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体の育種
- 参考例3で得られたロイシン脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドを制限酵素EcoRIとPstIで切断し、ロイシン脱水素酵素遺伝子を含むDNA断片をTaKaRaRECOCHIP(タカラバイオ社製)を用いて回収した。
- [0089] 同様に、参考例2で得られたギ酸脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドをギ酸脱水素酵素遺伝子の下流のEcoRI、PstI部位で切断したDNA断片と、上記ロイシン脱水素酵素遺伝子を含むDNA断片をT4 DNAリガーゼを用いて結合することにより、ロイシン脱水素酵素及びギ酸脱水素酵素を大量に発現できるように設計されたプラスミドを取得した。
- [0090] 得られたプラスミドをエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) HB101のコンピテントセルと混合し形質転換を行なうことで、ロイシン脱水素酵素活性及びギ酸脱水素酵素活性を有する形質転換体を育種した。

請求の範囲

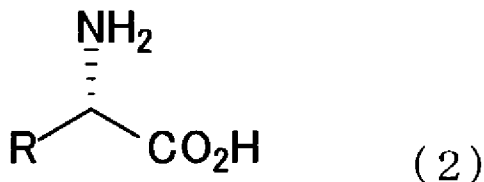
[1] 一般式(1):

[化1]



(式中、Rは置換基を有していてもよい炭素数1～20のアルキル基、置換基を有していてもよい炭素数7～20のアラルキル基、もしくは置換基を有していてもよい炭素数6～20のアリール基を表す。)で表されるケト酸に、アミノ酸脱水素酵素、及び補酵素再生能を有する酵素を作用させて、一般式(2):

[化2]



(式中、Rは前記と同じ)で表されるL-アミノ酸に変換する反応において、補酵素を2回以上に分割して反応に添加することを特徴とするL-アミノ酸の製造方法。

[2] ケト酸の純度が95%以下であることを特徴とする請求項1に記載の製造方法。

[3] 反応開始時における補酵素の添加量が、反応を通じての総添加量の4分の3以下であることを特徴とする請求項1、又は2に記載の製造方法。

[4] 1回の補酵素の添加量が、反応を通じての総添加量の2分の1以下であることを特徴とする請求項1から3のいずれかに記載の製造方法。

[5] 補酵素を連続的に添加することを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載の製造方法。

[6] 補酵素がNADである請求項1から5のいずれかに記載の製造方法。

[7] L-アミノ酸がL-tert-ロイシン、又はL-4-メチルロイシンである請求項1から6

のいずれかに記載の製造方法。

- [8] アミノ酸脱水素酵素がロイシン脱水素酵素、又はフェニルアラニン脱水素酵素である請求項1から7のいずれかに記載の製造方法。
- [9] 補酵素再生能を有する酵素がギ酸脱水素酵素、又はグルコース脱水素酵素である請求項1から8のいずれかに記載の製造方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069805

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12P13/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n		
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) C12P13/04, C12N15/09		
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) MEDLINE (STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X /Y	JP 62-244386 A (Sagami Chemical Research Center), 24 October, 1987 (24.10.87), & EP 0206460 A2 & US 4849345 A	1, 5, 8, 9 /2-4, 6, 7
Y	WO 2005/093081 A1 (DEGUSSA AG.), 06 October, 2005 (06.10.05), & EP 1727908 A1 & JP 2007-529234 A	1-9
Y	JP 2004-159587 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 10 June, 2004 (10.06.04), (Family: none)	1-9
Y	JP 63-258590 A (Mitsui Petrochemical Industries, Ltd.), 26 October, 1988 (26.10.88), & US 5034320 A	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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	"T"
"E"	earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X"
"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)	"Y"
"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 15 January, 2008 (15.01.08)		Date of mailing of the international search report 29 January, 2008 (29.01.08)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2007/069805

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E, Y	WO 2007/114217 A1 (Kaneka Corp.), 11 October, 2007 (11.10.07), (Family: none)	1-9
A	JP 2002-171993 A (Ikeda Shokken Kabushiki Kaisha), 18 June, 2002 (18.06.02), (Family: none)	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12P13/04(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n		
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. C12P13/04, C12N15/09		
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) MEDLINE(STN), JMEDPlus/JST7580/JSTPlus(JDream2)		
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 /Y	JP 62-244386 A (財団法人 相模中央化学研究所) 1987.10.24 & EP 0206460 A2 & US 4849345 A	1,5,8,9 /2-4,6,7
Y	WO 2005/093081 A1 (DEGUSSAAG) 2005.10.06 & EP 1727908 A1 & JP 2007-529234 A	1-9
Y	JP 2004-159587 A (三菱レイヨン株式会社) 2004.06.10 (ファミリーなし)	1-9
Y	JP 63-258590 A (三井石油化学工業株式会社) 1988.10.26 & US 5034320 A	1-9
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願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 1 5 . 0 1 . 2 0 0 8	国際調査報告の発送日 2 9 . 0 1 . 2 0 0 8	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 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) 植原 克典 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8	4 B 3 8 4 5

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
E,Y	WO 2007/114217 A1 (株式会社カネカ) 2007.10.11 (ファミリーなし)	1-9
A	JP 2002-171993 A (池田食研株式会社) 2002.06.18 (ファミリーなし)	1-9