

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4326595号  
(P4326595)

(45) 発行日 平成21年9月9日(2009.9.9)

(24) 登録日 平成21年6月19日(2009.6.19)

(51) Int.Cl.		F I
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 N 1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 P 13/02	(2006.01)	C 1 2 P 13/02
C 1 2 R 1/06	(2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 1 2 R 1/07	(2006.01)	C 1 2 R 1:06

請求項の数 22 (全 35 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-504811
(86) (22) 出願日	平成9年7月10日(1997.7.10)
(65) 公表番号	特表2000-513942(P2000-513942A)
(43) 公表日	平成12年10月24日(2000.10.24)
(86) 国際出願番号	PCT/EP1997/003670
(87) 国際公開番号	W01998/001568
(87) 国際公開日	平成10年1月15日(1998.1.15)
審査請求日	平成16年5月20日(2004.5.20)
(31) 優先権主張番号	1723/96
(32) 優先日	平成8年7月10日(1996.7.10)
(33) 優先権主張国	スイス(CH)
(31) 優先権主張番号	500/97
(32) 優先日	平成9年3月3日(1997.3.3)
(33) 優先権主張国	スイス(CH)

(73) 特許権者	398075600 ロンザ アーゲー スイス国、シーエイチー4052 バーゼル、 ミュンヘンシュタイナーシュトラッセ 38
(74) 代理人	100058479 弁理士 鈴江 武彦
(74) 代理人	100091351 弁理士 河野 哲
(74) 代理人	100088683 弁理士 中村 誠
(74) 代理人	100108855 弁理士 蔵田 昌俊
(74) 代理人	100075672 弁理士 峰 隆司

微生物の受託番号 DSM 11009

最終頁に続く

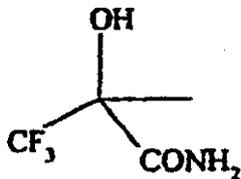
(54) 【発明の名称】 (S) —または (R) —3, 3, 3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸の製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

式

【化1】



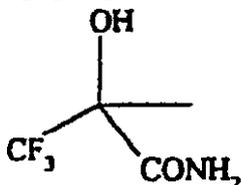
VI

で表されるプロピオンアミドのラセミ体形態またはその光学活性異性体形態を唯一の窒素源として利用する能力を有する、クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) PRS1 (DSM 11009)。

【請求項2】

式

【化2】



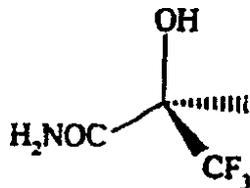
VI

で表されるプロピオンアミドのラセミ体形態またはその光学活性異性体形態を唯一の窒素源として利用する能力を有する、シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) (DSM 11010)。

【請求項 3】

請求項 1 に記載のクレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) PRS1 (DSM 11009) であって、式

【化 3】



VIII

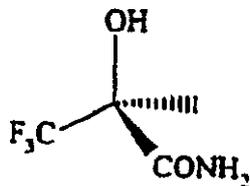
10

で表される (R)-プロピオンアミドを優先的に唯一の窒素源として利用する能力を有する、クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) PRS1 (DSM 11009)。

【請求項 4】

請求項 2 に記載のシュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) (DSM 11010) であって、式

【化 4】



VII

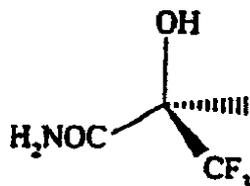
20

で表される (S)-プロピオンアミドを優先的に唯一の窒素源として利用する能力を有する、シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) (DSM 11010)。

【請求項 5】

式

【化 5】



VIII

30

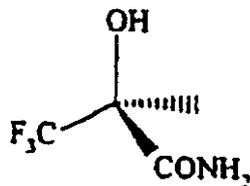
で表される (R)-プロピオンアミドを優先的に唯一の窒素源として利用する能力を有する微生物に由来する酵素抽出物であって、

クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) PRS1 (DSM 11009) の微生物に由来する、(R)-アミドヒドロラーゼ活性を有する酵素抽出物。

【請求項 6】

式

【化 6】



VII

40

で表される (S)-プロピオンアミドを優先的に唯一の窒素源として利用する能力を有する微生物に由来する酵素抽出物であって、

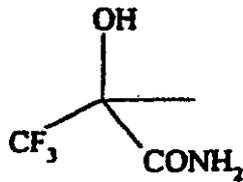
シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) (DSM 11010) の微生物に由来する、(S)-アミドヒドロラーゼ活性を有する酵素抽出物。

【請求項 7】

50

アミドヒドロラーゼ活性を有し、式

【化 7】



VI

で表される (R)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオンアミドを加水分解する能力を有する、配列番号 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド。

【請求項 8】

請求項 7 に記載のポリペプチドをコードする DNA 配列。

【請求項 9】

請求項 7 に記載のポリペプチドを宿主内で発現させるための DNA 配列であって、以下から選択される DNA 配列：

配列番号 1 のヌクレオチド配列を含む DNA 配列；および

67 の温度および 0.8M の塩というストリンジェントな条件下で、前記配列のコード領域とハイブリダイズする DNA 配列。

【請求項 10】

図 1 に示される制限地図により特徴づけられる請求項 8 または 9 に記載の DNA 配列。

【請求項 11】

請求項 8 ~ 10 の何れか 1 項に記載の DNA 配列を含有する組換え DNA 分子またはベクター。

【請求項 12】

プラスミド pPRS1b、pPRS7、pPRS4 またはプラスミド pPRS2a である、請求項 11 に記載の組換え DNA 分子。

【請求項 13】

請求項 11 または 12 に記載の組換え DNA 分子またはベクターを含有する大腸菌 (*Escherichia coli*)。

【請求項 14】

プラスミド pPRS1b、pPRS2a、pPRS4 またはプラスミド pPRS7 を含有する微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5。

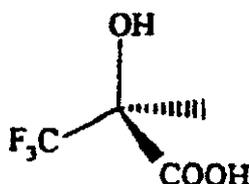
【請求項 15】

プラスミド pPRS1b、pPRS2a、pPRS4 またはプラスミド pPRS7 を含有する微生物大腸菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue MRF' (登録商標)。

【請求項 16】

式 I

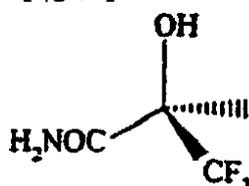
【化 8】



I

で表される (S)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸および/または式 VIII

【化 9】



VIII

で表される (R)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオンアミドの製造方法

10

20

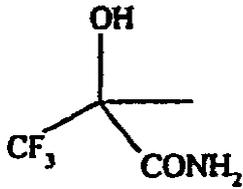
30

40

50

であって、式VI

【化10】



VI

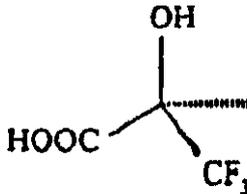
で表されるプロピオンアミドを、請求項2または4に記載の微生物により、あるいは請求項6に記載の酵素抽出物により、式Iで表される化合物へ変換し、所望により、この化合物および/またはこの変換中に生成する式VIIIの化合物を単離することを含む製造方法。

10

【請求項17】

式II

【化11】

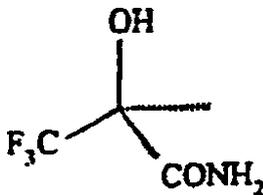


II

で表される(R)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸および/または式VII

20

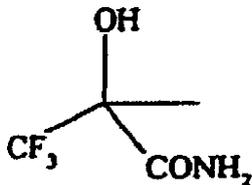
【化12】



VII

で表される(S)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオンアミドの製造方法であって、式VI

【化13】



VI

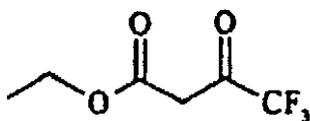
で表されるプロピオンアミドを、請求項1または3に記載の微生物により、請求項13~15の何れか1項に記載の微生物により、請求項5に記載の酵素抽出物により、あるいは請求項7に記載のポリペプチドにより、式IIで表される化合物へ変換し、所望により、この化合物および/またはこの変換中に生成する式VIIで表される化合物を単離することを含む製造方法。

30

【請求項18】

請求項16または17に記載の製造方法であって、第1工程で、式

【化14】

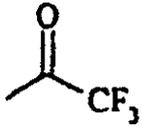


III

で表されるトリフルオロアセタートを、鉍酸を使用して、式

40

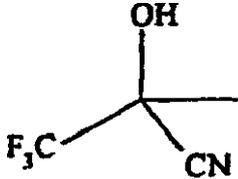
【化 1 5】



IV

で表されるトリフルオロアセトンに変換し、これを第 2 工程で、シアン化物を使用して、式

【化 1 6】

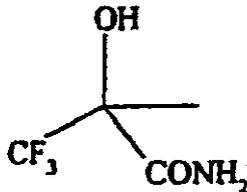


V

10

で表されるプロピオニトリルに変換し、これを第 3 工程で、濃鉍酸を使用して化学的に、又はロドコッカス (Rhodococcus) 属の突然変異微生物を使用して微生物学的に、式

【化 1 7】

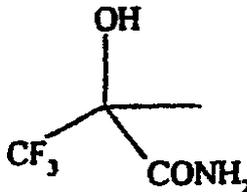


VI

20

で表されるプロピオンアミドに変換することにより、式

【化 1 8】



VI

で表されるプロピオンアミドを得ることを特徴とする製造方法。

【請求項 1 9】

第 1 工程および第 3 工程で使用する鉍酸が、硫酸、リン酸または硝酸であることを特徴とする、請求項 1 8 に記載の製造方法。

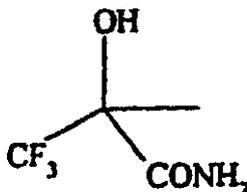
【請求項 2 0】

第 2 工程で使用するシアン化物が、シアン化アルカリ金属であることを特徴とする、請求項 1 8 または 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

式

【化 1 9】



VI

40

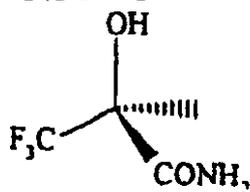
で表されるプロピオンアミドの変換を、クレブシエラ (Klebsiella) 属、ロドコッカス (Rhodococcus) 属、アルスロバクター (Arthrobacter) 属、バシラス (Bacillus) 属、エシェリキア (Escherichia) 属、コマモナス (Comamonas) 属、アシネトバクター (Acinetobacter) 属、リゾビウム (Rhizobium) 属、アグロバクテリウム (Agrobacterium) 属、リゾビウム / アグロバクテリウム (Rhizobium/Agrobacterium) 属、またはシュードモナス (Pseudomonas) 属の微生物を使用して行なうことを特徴とする、請求項 1 6 ~ 2 0 の何れか 1 項に記載の製造方法。

50

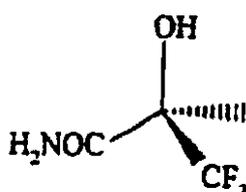
## 【請求項 2 2】

式

【化 2 0】



VII



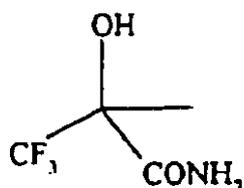
VIII

で表される(S)-または(R)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオンアミドを、塩基の存在下で化学的に又はロドコッカス(Rhodococcus)属の微生物を使用して微生物学的に、式IまたはIIで表される化合物へ加水分解することを特徴とする、請求項16~21の何れか1項に記載の製造方法。

10

## 【発明の詳細な説明】

本発明は、(S)-または(R)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸の新規製造法、および式



VI

で表されるプロピオンアミドのラセミ体形態またはその光学活性異性体形態を唯一の窒素源として利用する能力を有する新規微生物に関する。

20

(S)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸は、治療用アミドの重要な製造用中間体である(EP-A 0 524 781)。

以下の記載においては、3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸を2,2-HTFMPSと、3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオンアミドを2,2-HTFMPAと略称する。

J. Chem. Soc., 1951, p. 2329には、ジメトキシストリキニーネを用いて、対応するラセミ体を所望の(S)エナンチオマーに変換する(S)-2,2-HTFMPSの製造法が記載されている。

この製造法の欠点は、ラセミ体分割に使用するジメトキシストリキニーネが非常に高価なことである。

30

EP-A 0 524 781には、(S)-(-)-2-メチルベンジルアミンを用いて、対応するラセミ体を所望の(S)エナンチオマーに変換する(S)-HTFMPSの製造法が記載されている。この製造法の欠点は、多量の(S)-(-)-2-メチルベンジルアミンを使用しなければならないため、この場合もまた非常に経費がかかる製造法となることである。

本発明の目的は、(S)-または(R)-2,2-HTFMPSの技術的に可能で経済的な製造法を提供することである。

この目的は、本発明の請求項1および請求項11に記載の微生物、請求項4に記載のポリペプチドならびに請求項15および16に記載の製造法により達成される。

したがって、本発明は、野生のいわゆる「野生型」微生物から選ばれる微生物、それ由来の酵素抽出物、立体特異的アミドヒドロラーゼ活性を有するそれから単離された酵素、および「野生型」から単離された立体特異的アミドヒドロラーゼをコードするDNA/DNA断片に関する。さらに、本発明は、これらのDNA断片またはベクターを含むいわゆる遺伝的に操作された微生物に関する。もう一つの主題は、前記微生物を使用する(S)-または(R)-2,2-HTFMPSの製造法および(S)-または(R)-2,2-HTFMPAの製造法である。

40

本発明は、以下の図面により更に詳しく例示される。

図1は、単離されたDNAの制限地図を示す。

図2は、プラスミドpPRS1bを示す。

図3は、プラスミドpPRS2aを示す。

図4は、該アミドヒドロラーゼの最適pHを示す。

50

図5は、該アミドヒドロラーゼのミカエリス - メンテン速度論を示す。

図6は、該アミドヒドロラーゼの最適温度を示す。

図7は、該アミドヒドロラーゼに対するメタノールの効果を示す。

本発明の「野生型」は、通常の微生物学的方法を用いて土壌サンプル、汚泥または排水から単離することができる。本発明では、これらを、適当な炭素源と共に、式VIのプロピオンアミドのラセミ体形態またはその光学活性異性体形態の1つを唯一の窒素源として含む培地内で常法により培養することにより、そのような単離を行なう。ついで、式VIのプロピオンアミドを唯一の窒素源として利用する安定なものを、培養により得られる培養物から選択する。

「野生型」は、適当な炭素源としての糖、糖アルコールまたはカルボン酸を成長基質として利用する能力を有する。使用しうる糖としては、例えば、グルコース、アラビノース、ラムノース、ラクトースまたはマルトースが挙げられる。使用しうる糖アルコールとしては、例えば、ソルビトール、マンニトールまたはグリセロールが挙げられる。クエン酸は、使用しうるカルボン酸の一例である。炭素源としては、グリセロールまたはグルコースが好ましく使用される。

使用しうる選択培地および増殖培地としては、当業者が通常使用するもの、例えば、Kull aら, Arch. Microbiol. 135, pp. 1-7, 1983に記載の無機塩培地が挙げられる。

増殖中および選択中に該微生物の活性酵素を誘導するのが好都合である。式VIで表されるプロピオンアミドのラセミ体形態もしくはその光学活性異性体形態の1つ、アセトアミドまたはマロン酸ジアミド形態を、酵素誘導物質として使用することができる。

増殖および選択は、通常、0 ~ 42 °C、好ましくは20 ~ 37 °Cの温度、および4 ~ 9のpH、好ましくは6 ~ 8のpHで行なう。

好ましい「野生型」は、プロピオンアミド(式VI)を利用するロドコッカス(Rhodococcus)属、アルスロバクター(Arthrobacter)属、バシラス(Bacillus)属およびシュードモナス(Pseudomonas)属のものが挙げられる。特に好ましいのは、クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca) PRS1 (DSM 11009)、クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca) PRS1K17 (DSM 11623)、シュードモナス・エスピー(Pseudomonas sp.) (DSM 11010)、ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus) ID-622 (DSM 11344)、アルスロバクター・ラモサス(Arthrobacter ramosus) ID-620 (DSM 11350)、バシラス・エスピー(Bacillus sp.) ID-621 (DSM 11351)、クレブシエラ・プランティクラ(Klebsiella planticola) ID-624 (DSM 11354) およびクレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae) ID-625 (DSM 11355)の種の微生物、ならびにそれらの機能的に等価な変異体および突然変異体である。クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca) (DSM 11009)、クレブシエラ・プランティクラ(Klebsiella planticola) ID-624 (DSM 11354) およびクレブシエラ・ニューモニエ(Klebsiella pneumoniae) ID-625 (DSM 11355)の「野生型」は、(R)-アミドヒドロラーゼ活性を優先的に有し、シュードモナス・エスピー(Pseudomonas sp.) (DSM 11010)、ロドコッカス・オパクス(Rhodococcus opacus) ID-622 (DSM 11344)、アルスロバクター・ラモサス(Arthrobacter ramosus) ID-620 (DSM 11350) およびバシラス・エスピー(Bacillus sp.) ID-621 (DSM 11351)の「野生型」は、(S)-アミドヒドロラーゼ活性を優先的に有する。DSM 11010、DSM 11009と称される微生物は1996年6月24日に、DSM 11355、DSM 11354と称される微生物は1996年12月27日に、DSM 11351、DSM 11350およびDSM 11344と称される微生物は1996年12月13日に、DSM 11623と称される微生物は1997年6月20日に、ブダペスト条約に基づき、ドイチェ・ザムルング・フォン・ミクロオルガニズメン・ウント・ツェルクルテュレン・ゲーエムベーハー、マスケローダーベーグ 1ベー、デー - 38124 ブラウンシュバイク(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroderweg 1b, D-38124 Braunschweig)に寄託されている。

「野生型」の「機能的に等価な変異体および突然変異体」は、もとの微生物と実質的に同じ特性と機能とを有する株を意味すると理解されるべきである。そのような変異体および突然変異体は、例えば紫外線照射によりランダムに、あるいは例えばインターカレート物

10

20

30

40

50

質（例えば、アクリジン色素）による化学突然変異誘発により特異的に生成させることができる。

クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1 (DSM 11009) の分類学的記載

細胞の形状	桿状	
幅 ( $\mu\text{m}$ )	1.0~1.2	
長さ ( $\mu\text{m}$ )	1.2~2.0	10
運動性	—	
グラム反応	—	
3%KOH による溶菌	+	
アミノペプチダーゼ (Cerny)	+	
孢子	—	
オキシダーゼ	—	
カタラーゼ	+	20
嫌気性増殖	+	
グルコースからの気体	+	
以下からの酸 (ASA)		

グルコース	+	
フルクトース	+	
キシロース	+	
エリトリトール	-	
アドニトール	+	
D-マンノース	+	10
L-ラムノース	+	
イノシトール	+	
ソルビトール	+	
$\alpha$ -メチル-D-グルコシド	+	
セロビオース	+	
マルトース	+	20
ラクトース	+	
D-アラビトール	+	
ONPG	+	
ADH	-	
LDC	w	
ODC	-	
VP	+	30
インドール	+	
H <sub>2</sub> S の生成	-	
シモンズクエン酸塩	+	
ウレアーゼ	+	
メチルレッド	-	
以下の加水分解		40
ゼラチン	-	
DNA	-	
Tween 80	-	

シュードモナス・エスピー (Pseudomonas sp.) (DSM 11010) の分類学的記載

細胞の形状	桿状	
幅 ( $\mu\text{m}$ )	0.7~0.8	
長さ ( $\mu\text{m}$ )	1.5~3.5	
運動性	+	
グラム反応	-	10
3%KOHによる溶菌	+	
アミノペプチダーゼ (Cerny)	+	
孢子	-	
オキシダーゼ	+	
蛍光	+	
カタラーゼ	+	20
41°Cでの増殖	-	
ADH	+	
ウレアーゼ	-	
ゼラチンの加水分解	+	
硝酸塩の還元	-	
脱窒	-	
スクロースからのレバン	+	30
レシチナーゼ	+	
基質の利用		
アジピン酸塩	-	
クエン酸塩	+	
マレイン酸塩	+	
L-マンデル酸塩	-	40
酢酸フェニル	-	
D-グルコース	+	

マルトース	—
トレハロース	+
マンニトール	+
アドニトール	+
アセトアミド	+
馬尿酸塩	—
トリプタミン	—
ブチルアミン	—

10

## 略語

ASA：アセチルサリチル酸

ONPG：O-ニトロ-フェニルガラクトシダーゼ

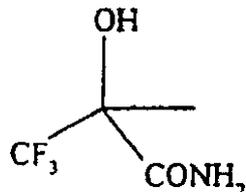
ADH：アルコールデヒドロゲナーゼ

LDC：乳酸デカルボキシラーゼ

ODC：オルニチンデカルボキシラーゼ

VP：フォゲス・プロスカウエル

立体特異的アミドヒドロラーゼ活性を有する本発明の酵素は、例えば、式



VI

30

で表されるプロピオンアミドのラセミ体形態またはその(R)異性体形態を加水分解する能力を有する前記の「野生型」ならびにその機能的に等価な変異体および突然変異体から得ることができる。

該酵素の「機能的に等価な変異体および突然変異体」は、実質的に同じ特性と機能とを有する酵素を意味すると理解されるべきである。そのような変異体および突然変異体は、例えば突然変異によりランダムに生成させることができる。

該酵素は、

a) pH10 ± 0.5の最適pH、

b) pH10で65 ~ 70 の最適温度、および

c) 32mM (100mM CAPS緩衝液(3-(シクロヘキシルアミノ)-1-プロパンスルホン酸)(pH10)中、60 )の、基質(R)-2,2-HTFMPAに関する $K_M$ 値、特に、

40

d) 5 ~ 20%のメタノール濃度が抑制効果を有し、

e) N末端アミノ酸配列がMet-Lys-Trp-Leu-Glu-Glu-Ser-Ile-Met-Ala-Lys-Arg-Gly-Val-Gly-Ala-Ser-Arg-Lys-Proであることにより特徴づけるのが好都合である。

この立体特異的アミドヒドロラーゼは、式VIで表されるプロピオンアミドのラセミ体形態またはそのR異性体形態を唯一の窒素源として利用する能力を有する前記の「野生型」から単離することができる。該アミドヒドロラーゼは、「野生型」のクレブシエラ(Klebsiella)属、好ましくはクレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca) PRS1 (DSM 11009) またはクレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca) PRS1K17 (DSM 11623) から

50

単離するのが好都合である。

勿論、この酵素は、これらの「野生型」に由来する遺伝的に操作された微生物からも単離することができる。

立体特異的アミドヒドロラーゼを得るためには、炭素源、窒素源、無機塩およびビタミン源を含む水性栄養培地内で常法で該「野生型」を増殖させる（培養する）。該「野生型」は、20~35の温度およびpH6~8で培養するのが好都合である。ついで、例えばフレンチプレスを用いて細胞破壊を行なった後、それ自体は公知の酵素精製方法により該酵素を単離することができる。

特に配列番号（SEQ ID No.）2のアミン酸配列により示される立体特異的アミドヒドロラーゼをコードし、図1に示す制限地図および特に配列番号1のヌクレオチド配列により特徴づけられる本発明のDNAまたは本発明のDNA断片は、また、それらの機能的に等価な遺伝子変異体および突然変異体、すなわち、野生型生物の遺伝子に由来する遺伝子のうち、その遺伝子産物とその生物学的機能に関して実質的に未修飾であるものを含む。したがって、機能的に等価な遺伝子変異体および突然変異体は、例えば、遺伝暗号の公知の縮重の範囲内の塩基交換を含む。なぜなら、該遺伝子配列を、発現が生じる或る特定の微生物の好ましいコドン使用頻度に適合させるために、それらを例えば人工的に生成させることが可能だからである。また、該遺伝子変異体および突然変異体は、塩基またはコドンの欠失、挿入および置換を含む（ただし、これは、このようにして修飾された遺伝子の遺伝子産物が、それらの生物学的機能に関して実質的に未変更のままである場合に限られる）。これは、例えば、野生型の配列に対して高度の相同性（例えば、70%を超える相同性）を示し、厳しいハイブリダイゼーション条件下、例えば、60~70の温度および0.5~1.5Mの塩含量（特に、67の温度および0.8Mの塩含量）で野生型配列の相補鎖とハイブリダイズする遺伝子配列を含む。

本発明の立体特異的アミドヒドロラーゼを単離するための出発物質として使用する前記の「野生型」は、本発明のDNAの出発物質として使用することができる。

本発明の無傷の遺伝子または無傷のDNA断片は、該アミドヒドロラーゼ遺伝子の部分配列を含有する標識オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによる公知方法でアミドヒドロラーゼ遺伝子またはその断片を単離しクローニングすることが可能な適当な微生物（例えば、クレブシエラ・オキシトカ（*Klebsiella oxytoca*））に関する遺伝子ライブラリーから、公知の方法により単離することができる。以下、該アミドヒドロラーゼ遺伝子をsadと略称することにする。

転写を促進させるために、好ましくは、sad遺伝子を強力なプロモーターの制御下に配置する。プロモーターの選択は、所望の発現条件、例えば、構成的発現または誘導的発現が望ましいか否か、あるいは発現を引き起こす微生物に左右される。

適当なプロモーターとしては、ファージのプロモーター $P_L$ および $P_R$ （Schauderら、Gene、52、279-283、1987を参照されたい）、 $P_{trc}$ プロモーター（Amannら、Gene、69、301-315、1988）、プロモーター $P_{Nm}$ 、 $P_{S1}$ （M. Labesら、Gene、89、37-46、1990）、 $P_{trp}$ プロモーター（Amannら、Gene、25、167-178、1983）、 $P_{lac}$ プロモーター（Amannら、Gene、25、167-178、1983）ならびに構成的または誘導的プロモーターとして使用しうる前記 $P_{tac}$ および $P_{lac}$ プロモーターのハイブリッドである $P_{tac}$ プロモーター（RusselおよびBennett、Gene、20、231-243、1982）が挙げられる。好ましくは、 $P_{lac}$ プロモーターを使用する。本発明のDNA断片は、例えば、適当な生産株内での(R)-2,2-HTFMPSの製造における使用には、適当な公知ベクター内、好ましくは、発現ベクター内に公知方法で組込むのが好都合である。ベクターとしては、自律的および自己複製プラスミドまたは組込みベクターを使用することができる。

選択したベクターの型に応じて、種々の微生物内でsad遺伝子を発現させることができる。適当なベクターとしては、特異的な宿主域を有するベクターと、広い宿主域を有するベクターとの両方が挙げられる。特異的な宿主域を有するベクターとしては、例えば、大腸菌（*E. coli*）に関しては、pBR322（Bolivarら、Gene、2、95-113）、商業的に入手可能なpBLUESCRIPT-KS+ R、pBLUESCRIPT-SK+ R（Stratagene）、pUC18/19（Yanisch-

10

20

30

40

50

Perronら, Gene 33, 103-119, 1985)、pK18/19 (Pridmore, Gene, 56, 309-312, 1987)、pRK290X (Alvarez-Moralesら, Nucleic Acid Research, 14, 4207-4227) およびpRA95 (Nycomed Pharmas AS, Huidove, Denmarkから入手可能)が挙げられる。好ましくは、pB LUESCRIPT-KS+ R を使用する。

広い宿主域のベクターとしては、グラム陰性菌に適したすべてのベクターを使用することができる。そのような広い宿主域のベクターとしては、例えば、pRK290 (Dittaら, PNAS, 77, 7347-7351, 1980) またはそれらの誘導体、pKT240 (Bagdasarianら, Gene, 26, 273-282, 1983) またはその誘導体、pGSS33 (Sharpe, Gene, 29, 93-102, 1984)、pVK100 (KnaufおよびNester, Plasmid, 8, 45-54, 1982) およびその誘導体、pME285 (HaasおよびItoh, Gene, 36, 27-36, 1985) およびその誘導体が挙げられる。

10

例えば、プラスミドpPRS1b (図2)、pPRS2a (図3)、pPRS4およびpPRS7は、このようにして入手した。

発酵のための生産株(すなわち、例えば(R)-2,2-HTFMPSの製造に使用しうる株)を得るためには、本発明のベクターまたはDNA断片を、発現に適した所望の宿主株内に導入しなければならない。この目的には、該微生物を、それ自体公知の常法により、本発明のDNA断片を含有するベクターで形質転換するのが好都合である。したがって、該微生物は、本発明のDNA断片をベクター分子上に又は染色体内に組込まれた形態で含有することが可能である。

適当な宿主株、好ましくは、基質および出発物質に対して高い許容性を有する株としては、例えば、シュードモナス(Pseudomonas)属、コマモナス(Comamonas)属、バシラス(Bacillus)属、ロドコッカス(Rhodococcus)属、アシネトバクター(Acinetobacter)属、リゾビウム(Rhizobium)属、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、リゾビウム(Rhizobium) / アグロバクテリウム(Agrobacterium)属またはエシェリキア(Escherichia)属の微生物が挙げられ、最後のものが好ましい。特に好ましいのは、大腸菌(Escherichia coli) DH5、大腸菌(Escherichia coli) XL1-Blue R および大腸菌(Escherichia coli) XL1-Blue MRF' R の微生物である。したがって、適当な生産株としては、例えば、プラスミドpPRS1b、pPRS2a、pPRS4またはpPRS7をそれぞれ含有する大腸菌(Escherichia coli) DH5および大腸菌(Escherichia coli) XL1-Blue MRF' R の種の微生物が挙げられる。

20

大腸菌(Escherichia coli) XL1-Blue MRF' R /pPRS2aの微生物は、ブダペスト条約に従い

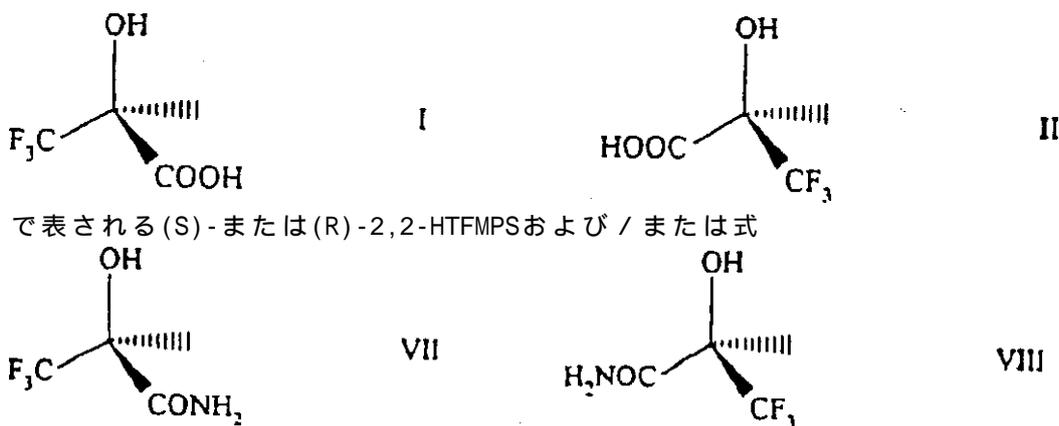
30

Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH、D-38124 Braunschweig、Mascheroderweg 1b

に1997年6月30日にDSM 11635で寄託されている。

形質転換された宿主株(生産株)は、該ベクター上または該DNA断片上に位置するマーカ-遺伝子により該株が耐性を示す抗生物質を補充した選択栄養培地から分離することができる。

式

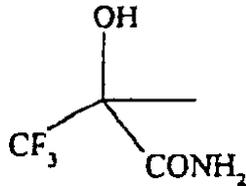


40

で表される(S)-または(R)-2,2-HTFMPSおよび / または式

50

で表される(R)-または(S)-2,2-HTFMPAの本発明の製造法は、式



VI

で表されるプロピオンアミドを、本発明の前記微生物により、あるいは立体特異的アミドヒドロラーゼ活性を示すそれから単離された酵素により変換することを含む。

(R)-2,2-HTFMPAおよび/または(S)-2,2-HTFMPAの製造法は、「野生型」のクレブシエラ (*Klebsiella*) 属、好ましくは、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1 (DSM 11009)、クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1K17 (DSM 11623)、クレブシエラ・プランティクラ (*Klebsiella planticola*) ID-624 (DSM 11354)、クレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) ID-625 (DSM 11355) の種を使用して、あるいはこれらの「野生型」に由来する遺伝的に操作された微生物を使用して、あるいは立体特異的アミドヒドロラーゼ活性を有する酵素を使用して実施するのが好都合である。

(S)-2,2-HTFMPAおよび/または(R)-2,2-HTFMPAの製造法は、「野生型」のシュードモナス (*Pseudomonas*) 属、ロドコッカス (*Rhodococcus*) 属、アルスロバクター (*Arthrobacter*) 属またはバシラス (*Bacillus*) 属、特に、シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) (DSM 11010)、ロドコッカス・オパクス (*Rhodococcus opacus*) ID-622 (DSM 11344)、アルスロバクター・ラモサス (*Arthrobacter ramosus*) ID-620 (DSM 11350) およびバシラス・エスピー (*Bacillus sp.*) ID-621 (DSM 11351) の種を使用して実施するのが好都合である。

該生物変換は、常法で微生物を増殖させた後、休止細胞(炭素源およびエネルギー源をもちや要求しない非増殖細胞)上または増殖中の細胞上で行なうことができる。該生物変換は、好ましくは、休止細胞上で行なう。

該生物変換には、低いモル濃度のリン酸緩衝液、HEPES緩衝液、前記無機塩培地などの当業者が通常使用する培地を使用することができる。

該生物変換は、プロピオンアミド(式VI)を、該濃度が10重量%、好ましくは2.5重量%を超えないように1回または連続的に加えることにより行なうのが好都合である。

培地のpHは、4~10、好ましくは5~9.5とすることが可能である。該生物変換は、10~60、好ましくは20~40の温度で行なうのが好都合である。

得られた(S)-または(R)-2,2-HTFMPA、または(S)-または(R)-2,2-HTFMPAはそれぞれ、例えば抽出などの通常の後処理方法により単離することができる。

(S)-または(R)-2,2-HTFMPA、または(S)-または(R)-2,2-HTFMPAのそれぞれの収量は、培地内の栄養素を変化させることにより、および問題の微生物に発酵条件を適合させることにより常法で向上させることができる。

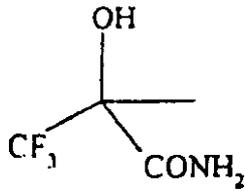
適宜、(S)-または(R)-2,2-HTFMPAを、塩基の存在下で化学的に又はロドコッカス (*Rhodococcus*) 属の微生物を使用して微生物学的に加水分解して、対応する酸を得る。

塩基としては、水酸化アルカリ金属を使用することができる。水酸化アルカリ金属として、水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウムを使用するのが好都合である。

該微生物学的加水分解は、ロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*)、ロドコッカス・ロドクラウス (*Rhodococcus rhodochrous*) またはロドコッカス・エスピー (*Rhodococcus sp.*) S-6の種の微生物を使用して、好ましくはロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*) TG 328 (DSM 6710) の種の微生物またはその機能的に等価な変異体および突然変異体を使用して行なうのが好都合である。ロドコッカス・エクイ (*Rhodococcus equi*) TG 328は、米国特許第5 258 305号に記載されており、ブダペスト条約に従い1991年9月13日にDeutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig, Mascheroderweg 1bに寄託されている。通常は、実際の微生物学的加水分解を行なう前に、これらの微生物をGilliganら (*Appl. Microbiol. Biotech.*, 39, 1993, 720-725) の方

法により増殖させる。原則として、該微生物学的加水分解は、当該技術分野で通常用いられている方法で行なう。該加水分解は、20~40 の温度およびpH 6 ~ 9で行なうのが好都合である。

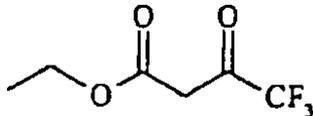
式



VI

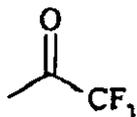
で表されるプロピオンアミドを得るには、まず第1工程において、式

10



III

で表されるトリフルオロアセタートを、鉍酸を使用して、式



IV

で表されるトリフルオロアセトンに変換する。

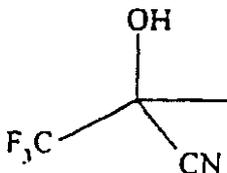
使用しうる鉍酸としては、塩酸、硫酸、硝酸またはリン酸が挙げられる。好ましく使用される酸は、硫酸、リン酸または硝酸、特に硫酸である。

20

該反応の第1工程は、極性プロトン性溶媒（例えば、低級アルコール、水または低級アルコール/水の混合物）中に行なうのが好都合である。使用しうる低級アルコールとしては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、tert-ブタノールまたはイソブタノールが挙げられる。

該反応の第1工程は、50~100 の温度、好ましくは70~95 の温度で行なうのが好都合である。

本発明の製造法の第2工程においては、トリフルオロアセトン（式IV）をシアン化物と反応させて、式



V

30

で表されるプロピオニトリルを得る。

好都合に使用されるシアン化物は、シアン化アルカリ金属、例えばシアン化ナトリウムまたはシアン化カリウム、好ましくはシアン化ナトリウムである。

該反応の第2工程は、鉍酸の存在下で行なうのが好都合である。適当な鉍酸としては、前記のものが挙げられる。好ましい鉍酸は硫酸である。通常、トリフルオロアセトンに対して過剰の鉍酸を使用する。トリフルオロアセトン1mol当たり1~10molの鉍酸を使用するのが好ましい。使用しうる溶媒は、第1工程のものと同じである。

40

第2工程は、-20~100、好ましくは0~20 の温度で行なうのが好都合である。

本発明の製造法の第3工程では、式Vで表されるプロピオニトリルを、濃鉍酸中で化学的に又はロドコッカス（Rhodococcus）属の突然変異微生物を使用して微生物学的に、式VIで表されるプロピオンアミドに変換する。

使用しうる鉍酸は、第1工程および第2工程と同じである。「濃鉍酸」は、以下においては、30~100%の強度の鉍酸を意味すると理解されるべきである。第3工程においては、75~100%の強度、好ましくは90~100%の強度の鉍酸を使用するのが好都合である。第3工程における化学反応は、0~160、好ましくは70~120 の温度で行なうのが好都合である。

ロドコッカス（Rhodococcus）属の突然変異微生物は、アミダーゼをもはや含有しておら

50

ず、したがって、アミドを対応する酸に変換する能力をもはや有していない。該突然変異は、常法 (J.H. Miller, Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972, p.24) により行なうことができる。好都合な突然変異法としては、フレームシフト法、欠失法またはトランスポゾン挿入法が挙げられる。

突然変異のための適当な微生物種は、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi)、ロドコッカス・ロドクラウス (Rhodococcus rhodochrous) またはロドコッカス・エスピー (Rhodococcus sp.) S-6である。前記のロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi) TG 328 (DSM 6710) を突然変異させて、ロドコッカス・エクイ (Rhodococcus equi) TG 328-2 (DSM 11636) およびその機能的に等価な変異体および突然変異体を得るのが好都合である。

微生物TG 328-2は、ブダペスト条約に従い

10

### Deutsche Sammlung

für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, D-38124 Braunschweig,

### Mascheroderweg 1b

に1997年6月30日に寄託されている。この微生物は、前記の未突然変異微生物と同じ条件下で培養する。

(R)-および(S)-2,2-HTFMPAは、今日まで文献未記載の化合物であり、したがって、これらもまた本発明の一部である。それらは、例えば塩基存在下での加水分解により(R)-または(S)-2,2-HTFMPSを製造するための新規中間体として使用することができる。

#### 実施例 1

20

##### トリフルオロアセトンの製造

濃硫酸 (強度96% ; Merck) 500g (4.9mol) を蒸留水1Lに加え、該混合物を73 に加熱した。ついでトリフルオロアセタート500g (2.69mol) をゆっくり加えると、その過程で2相が形成された。該バッチを還流温度まで加熱し、その過程で生じたトリフルオロアセトンを留去した。2時間後、約90%の収率に相当するトリフルオロアセトン293.8gを無色液体として単離した。GC分析は、92.1%の純度を示した。

#### 実施例 2

##### 2-ヒドロキシ-2-メチル-3,3,3-トリフルオロメチルプロピオニトリルの製造

シアン化ナトリウム39.4g (0.763mol) を蒸留水174mlに加え、該混合物を - 1 まで冷却した。ついでトリフルオロアセトン100g (0.822mol) を滴下したところ、その過程で該反応混合物の温度が6 まで上昇した。トリフルオロアセトンの添加の終了後、6N硫酸293.4g (1.4916molのH) を4 ~ 5 で加えた。ついで該反応混合物を室温で一晩攪拌した。ついで該バッチを酢酸エチルまたはtert-ブチルメチルエーテルで抽出し、合わせた有機相を32 で大気圧下または大気圧より若干低い圧力 (300 ~ 120mber) 下で蒸留した。合計88gの生成物 (GCによる測定で91.2%の純度) を得た。これは、75.6%の収率に相当する。

30

#### 実施例 3

##### a) (R,S)-2,2-HTFMPAの化学的製造

98%の強度の硫酸を、アルゴン雰囲気下で反応容器内に導入した。2-ヒドロキシ-2-メチル-3,3,3-トリフルオロメチルプロピオニトリル15g (GCで86.9%) をこれに加え、該反応混合物を95 に加熱した。出発物質を加えた後、該反応混合物を114 で15分間加熱した。ついで該反応混合物を5 に冷却したところ、その過程で粘性の褐色溶液が生じた。ついで蒸留水40gを滴下した。この過程で、該反応混合物の温度が15 を超えないように注意した。この過程で生じた黄色っぽい懸濁液を - 15 で15分間冷却し、ついで濾過した。濾過ケーキを氷冷水20mlで洗浄し、ついで真空中で乾燥した。これにより、淡黄色の粗製生成物12.64gが得られた。ついで該粗製生成物を酢酸エチル13ml中で還流し、ついで室温に冷却した。この懸濁液をヘキサン15mlで処理し、該混合物を0 に冷却した。ついで該混合物をヘキサンで、もう1回洗浄した。真空中での乾燥により生成物11.8gが得られた。これは、収率80.2%に相当する。

40

融点 : 143.1 ~ 144.3

50

b) (R,S)-2,2-HTFMPAの微生物的製造(ロドコッカス(Rhodococcus)属の突然変異微生物を使用)

突然変異のためには、ロドコッカス・エクイ(Rhodococcus equi)TG 328を、添加されたアクリジンICR191と共に、標準的な方法により「普通ブイヨン」中、30℃で一晩インキュベートした。ついで該細胞を収穫し、0.9%の強度のNaCl溶液を使用して洗浄した。ついで該細胞を、新鮮な培地中、30℃で一晩インキュベートした。

逆選択剤としてのフルオロアセトアミドの存在下、Gilliganら( Appl. Microbiol. Biotechnol., 39, 1993, 720-725)に記載されている無機塩培地中、該突然変異細胞を選択した。この逆選択剤は、増殖中の細菌を破壊するにすぎない。アミダーゼをもち含み(R,S)-2,2-HTFMPA上でもはや増殖しない突然変異体は生存し、濃縮される。ついで該細胞を収穫し、0.9%の強度のNaCl溶液で洗浄し、新鮮な培地中で一晩インキュベートし、ついでプレートアウト(plate out)した。該コロニーを、ニトリルヒドロラーゼ活性に関して試験した。所望の突然変異の頻度は2%であった。

ロドコッカス・エクイ(Rhodococcus equi)TG 328-2の突然変異体を、Gilliganら(同誌)に記載の無機塩培地中で増殖させた。洗浄した細胞を、37℃の100mMリン酸緩衝液(pH7.7)中の2-ヒドロキシ-2-メチル-3,3,3-トリフルオロメチルプロピオニトリル溶液(1%の強度)および(R,S)-2,2-HTFMPA溶液(1%の強度)の両方の共に、 $OD_{650nm}=5.0$ でインキュベートした。16時間後、GC分析は、該ニトリルが該アミドに定量的に変換されており、一方、該アミドが酸へ加水分解されていないことを示した。

#### 実施例 4

アミドヒドロラーゼを含有する微生物(野生型)による(S)-2,2-HTFMPAおよび(R)-2,2-HTFMPAの製造

##### 4.1 (R)-および(S)-アミダーゼ活性を有する微生物の選択および分離

リン酸緩衝液(0.1M, pH7.0)100mlを土壌サンプル10gに加え、該混合物を10分間放置し、濾過した。ついで該上清(5.0ml)または排水(ARA, Visp)1mlを、グリセロールおよび(R,S)-HTFMPA(炭素/窒素比5:1)を含有する無機塩培地(25ml; Kullaら, Arch. Microbiol. 135, pp. 1-7, 1983)中で継代培養した。ついで、(R)-および/または(S)-2,2-HTFMPAを唯一の窒素源として利用しうる混合培養が形成されるまで、この培養をインキュベートした。ついでこの培養を繰返し継代培養し、混合培養が形成されるまで30℃でインキュベートした。

通常の微生物学的手法を用いて、これらの微生物の純粋培養を維持した。

ついで、得られた微生物株を、(R,S)-2,2-HTFMPA上での増殖に関して寒天プレート上で試験した。陽性株を更に試験した。ついでこれらの株を使用して、予備培養培地に接種した。この予備培養内に含有されていた微生物を該無機塩培地に移し、ついでそれが(R)-2,2-HTFMPAおよび/または(S)-2,2-HTFMPAを唯一の窒素源として選択的に利用する能力に関して試験し、該上清を、(R)-2,2-HTFMPAまたは(S)-2,2-HTFMPAの形成に関して、およびそれらの2つのアミドエナンチオマーの一方の濃度に関してGCで調べた。

##### 4.2 (R)-または(S)-2,2-HTFMPAアミドヒドロラーゼ活性の測定

該ヒドロラーゼ活性を測定するために、該微生物懸濁液を650nmで4.0の光学濃度にした。0.5重量%の(R,S)-HTFMPAで捕捉したリン酸緩衝液(100mM, pH7.0)を、媒体として使用した。この懸濁液を、振とうしながら30℃で2時間インキュベートした。該ヒドロラーゼにより遊離した $NH_4^+$ を、比色定量により、あるいはアンモニウム電極を用いて測定し、HTFMPAをGCにより測定した。生成した1mmolの $NH_4^+$ が、変換された1mmolのHTFMPAに等しいという条件で、変換された(R)-または(S)-HTFMPAのg/l/時間/650nmでの光学濃度として、該活性を表した。

表1：クレブシエラおよびシュードモナスのヒドロラーゼ活性

株	ヒドロラーゼ活性	
	(R)-特異的	(S)-特異的
	(g/l/時間/O.D.650nm)	
DSM 11009 (クレブシエラ・オキシト カ PRS1)	0.11	—
DSM 11010 (シュードモナス・エスピ ー)	—	0.09

10

## 4.3 (S)-2,2-HTFMPAおよび(R)-2,2-HTFMPSの製造

クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1 (DSM 11009)、クレブシエラ・プランティクラ (*Klebsiella planticola*) ID-624 (DSM 11354) またはクレブシエラ・ニューモニエ (*Klebsiella pneumoniae*) ID-625 (DSM 11355) を、炭素源としてのグリセロールと唯一の窒素源としての(R,S)-2,2-HTFMPAとを含有する無機塩培地寒天プレート上、30℃で2日間インキュベートした。該無機塩培地の組成は、Kullara, Arch. Microbiol., 135, pp. 1-7, 1983に記載されている。プレティングしたこれらの微生物を使用して、30℃で2日間インキュベートしたのと同じ組成の予備培養培地をインキュベートした。誘導およびバイオマス生産のために、同じ無機塩培地(600ml)に予備培養50mlを接種し、該培地を30℃で21時間インキュベートした。ついで該細胞を遠心分離により収穫し、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.0)中に取った。該細胞を0.05Mリン酸緩衝液(500ml, pH8.0)に再懸濁した後、650nmで10の光学濃度を得、1.0重量%の(R,S)-2,2-HTFMPAを加えた。40℃で約5.5時間インキュベートした後、(R)-2,2-HTFMPAを、対応する酸に完全に変換した。これは、100%の光学純度(ee)および48%の収率に相当した。

20

該反応の経過は、NH<sub>4</sub><sup>+</sup>の遊離および該上清のGC分析に基づいてモニターした。

## 4.4 (S)-アミドヒドロラーゼを含有する微生物を使用する(S)-2,2-HTFMPSおよび(R)-2,2-HTFMPAの製造

シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) (DSM 11010)、ロドコッカス・オパクス (*Rhodococcus opacus*) ID-622 (DSM 11344)、アルスロバクター・ラモサス (*Arthrobacter ramosus*) ID-620 (DSM 11350) およびバシラス・エスピー (*Bacillus sp.*) ID-621 (DSM 11351) の微生物を、実施例4.1と同様にして分離した。誘導時間は2日間であり、その他のすべての条件は、実施例4.3と同じであった。

30

実施例4.3とは異なり、これらの微生物を使用する生物変換は、0.5重量%の(R,S)-2,2-HTFMPAで行なった。シュードモナス・エスピー (*Pseudomonas sp.*) (DSM 11010) 株は、(S)-特異的ヒドロラーゼを有し、pH6.0での該ヒドロラーゼの活性は、変換された(S)-2,2-HTFMPA (ee=86%) 0.09g/l/時間/O.D.650nmとして測定した。

## 4.5 (S)-2,2-HTFMPAおよび(R)-2,2-HTFMPSの後処理

## a) 抽出によるもの

(S)-2,2-HTFMPAおよび(R)-2,2-HTFMPS (実施例4.3から得たもの)、0.1Mリン酸緩衝液(250ml) (pH10) を含有する反応混合物196mlを、酢酸エチル(200ml)で3回抽出した。合わせた有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、ついで40℃、50mbarで蒸発させた。これにより、湿性生成物912mgを得た。この生成物を熱酢酸エチル(1.3ml)に溶解し、ついで該溶液を室温まで冷却した。ヘキサン(2ml)を加えることにより、該生成物が沈殿した。該混合物を0℃に冷却し、該生成物を濾去し、ついで真空中、50℃で乾燥した。これにより、使用量の半分に対して78.2%の収率に相当する(S)-2,2-HTFMPA 791mgを得た。(S)異性体のみが、キラルGC分析により確認された。残りの水相を濃HClでpH1にし、ついで酢酸エチル(200ml)で2回抽出した。該抽出物を40℃で蒸発させ、ついで乾燥した。ついでトルエン1mlを加え、該混合物を室温に冷却した。さらにヘキサン2mlを加え、該混合物を0℃に冷却

40

50

した。該固体をヘキサンで2～3回洗浄し、ついで乾燥した。真空中35℃での乾燥後に、該水相から合計664mgの(R)-2,2-HTFMPSを得た。これは、使用量の半分に対して65.7%の収率に相当する。(R)異性体のみが、キラルGC分析により確認された。

b) 電気透析によるもの((S)-2,2-HTFMPSの直接単離)

(S)-2,2-HTFMFAおよび(R)-2,2-HTFMPS(実施例4.3から得たもの)を含有する反応混合物を限外濾過に付して、細胞物質を除去した。得られた溶液を電気透析に付した。(R)-2,2-HTFMPSおよび全緩衝塩が、該膜中を移動した。電気透析が終了した後、純粋な(S)-2,2-HTFMFAの溶液(2342.2g)を得た。この溶液を135℃、20mbarで蒸留し、やがて生成物447gを得た。ついで固体NaOH(0.8mol)32.7gを加え、該反応混合物を3時間還流した。この時間の経過後、(S)-2,2-HTFMFAは完全に(S)-2,2-HTFMPSに変換されていた。該溶液を25℃未満の温度に冷却し、濃HCl93.6gを使用して、該pHを13.8から1.0にした。該水相を酢酸エチル(500ml)で2回抽出した。合わせた有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、ついで濾過した。粘性懸濁液が得られるまで、該溶液をロータリーエバポレーター上で濃縮した。この懸濁液を2回、それぞれトルエン20mlで処理し、ついで、得られた懸濁液を再濃縮した。ついで、さらにトルエン10mlを加え、ついで該混合物を還流した。該溶液を室温に冷却し、ヘキサン(30ml)で処理すると、やがて該生成物が沈殿した。該懸濁液を-10℃に冷却し、該生成物を限外濾過により集めた。真空中での乾燥(温度<35℃)により、純粋な(S)-2,2-HTFMPS(ee値99.7%)14.1g(0.0892g)が得られた。これは、収率35%(出発物質の半分に基づき計算)に相当する。

実施例5

a) (S)-2,2-HTFMFAから(S)-2,2-HTFMPSへの化学的加水分解

水酸化ナトリウム0.47g(11.6mmol)を蒸留水5mlに加えた。これに(S)-2,2-HTFMFA650mg(4.14mmol)を加え、該混合物を還流した。2時間後、該反応混合物を室温に冷却し、10%強度のHClを使用してpHを1.0にした。ついで該混合物を酢酸エチル(10ml)で2回抽出した。合わせた有機相をNa<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で乾燥し、濾過し、40℃以下で蒸発させた。真空オーブン中の乾燥(35℃で45分間)により、(S)-2,2-HTFMPS618mgを得た。これは、収率94.4%に相当する。この一方の異性体のみが、キラルGC分析により確認された。

b) (S)-2,2-HTFMFAから(S)-2,2-HTFMPSへの微生物的加水分解

ロドコッカス・エクイ(Rhodococcus equi)TG 328(DSM 6710)を、Gilliganら(同誌)に記載の無機塩培地中で増殖させた。洗浄したOD<sub>650nm</sub>=5.0の細胞を、(S)-2,2-HTFMFA溶液(100mMリン酸緩衝液中1%,pH7.7)と共に37℃でインキュベートした。16時間後、GC分析は、(S)-2,2-HTFMFAが(S)-2,2-HTFMPSへ定量的に変換されていたことを示した。

実施例6

6.1 クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)PRS1の莢膜陰性突然変異体

クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)PRS1は、望ましくない特性を発酵中に該株に付与する粘性莢膜を形成した。莢膜陰性株は、細胞分離およびそれに続く後処理の点で有利であった。

以下に記載のとおりアクリジンICR 191(J.H. Miller Experiments in Molecular Genetics, Cold Springs Harbor, 1972)を用いて、莢膜陰性突然変異体を分離した。

クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)PRS1を、アクリジンICR 191の存在下に0.2%のグルコースを含有する無機塩培地中に接種し、30℃で一晩インキュベートした。ついでこの培養を新鮮な培地中で継代培養し、再び30℃で一晩インキュベートした。該培養を希釈し、普通寒天上にプレーティングした。非粘性コロニーを拾い、調べた。該突然変異体が0.18%の頻度で分離された。そのような突然変異体の一例は、クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)PRS1K17(DSM 11623)である。この突然変異体は、野生型と同じ増殖挙動を示す。該(R)特異的酵素は、クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)PRS1と同じ活性を有するが、該株は粘性莢膜を形成しない。酵素の特徴づけおよび遺伝子クローニングのために、この突然変異体を使用した。

6.2 クレブシエラ・オキシトカ(Klebsiella oxytoca)PRS1K17(PRS1の莢膜陰性突然変異体)の染色体DNAの調製

10

20

30

40

50

クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1K17の新鮮な一晚培養物(栄養酵母ブロス100ml、30 )の染色体DNAを、R.H. Chesneyら(J. Mol. Biol., 130, 1979, 161-173)の改変法により単離した。

遠心分離(15分、6500×g、4 )により収穫した細胞を、Tris緩衝液(2.25ml, 0.05mol/l, pH 8.0, 10%(w/v)スクロース)に再懸濁した。

リゾチーム溶液(10mg/ml; 0.25mol/l Tris HCl緩衝液, pH8.0) 375 μlおよび0.1mol/l EDTA (pH8.0) 900 μlを加えた後、該懸濁液を氷上で10分間冷却した。ついで5%(w/v) SDS 450 μlおよびリボヌクレアーゼ(10mg/ml H<sub>2</sub>O) 50 μlを加え、該混合物を37 °Cで30分間インキュベートした。スパテルチップ一杯(spatula-tipful)のプロテイナーゼKおよびプロナーゼ(20ml/ml H<sub>2</sub>O) 400 μlを加えた後、インキュベーションを2時間継続した。CsCl 4.3gと混合した後、該混合物を遠心分離し(30分、40,000×g、20 )、臭化エチジウム(10mg/ml) 250 μlで処理し、該混合物を超遠心機(Vti 62.5管、8時間以上、246,000×g、20 )中で遠心分離した。該DNAバンドを、長波長紫外線下で該管から抜き取った。4 容量のTE緩衝液(10mmol/l Tris HCl, pH8.0, 1mmol/l EDTA)を加えた後、水で飽和させたn-ブタノールで該臭化エチジウムを3回抽出した。該DNAをイソプロパノールで沈殿させ、TE緩衝液中に取り、65 °Cで15分間インキュベートした。該物質は、4 °Cで保存することが可能であった。

### 6.3 染色体DNAの制限処理および連結

クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1K17の5 μgおよびベクターDNA (pBLUESCRIPT-KS+ R ) 4.5 μgをそれぞれ、制限緩衝液の合計容量100 μl中、20単位の制限酵素HindIIIで切断した(37 °Cで6.5時間)。該DNAをエタノールで沈殿させ、Speed Vac<sup>R</sup>濃縮器中で乾燥した。該沈殿物を連結緩衝液(20mmol/l Tris緩衝液, 10mmol/l DTT(ジチオトレイトール), 10mmol/l MgCl<sub>2</sub>, 0.6mol/l ATP(アデノシン三リン酸), pH7.2) 中に取り、合わせた(連結容量100 μl)。

1 単位のT4 DNAリガーゼを加えた後、該混合物を13 °Cで一晩インキュベートした。該連結混合物のDNAをイソプロパノールで沈殿させ、形質転換のために水30 μl中にとった。

### 6.4 大腸菌XL1-Blue MRF' R の形質転換および選択

コンピテント大腸菌(*E. coli*) XL1-Blue MRF' R 細胞を、S. FiedlerおよびR. Wirth (Analyt. Biochem., 170, 1988, 38-44)が記載している方法に従いエレクトロポレーションにより該連結混合物で形質転換した。

プラスミドを検出するために、アンピシリン(100 μg/ml)により普通寒天上で選択を行ない、「インサート」を検出するために、37 °Cでのインキュベーション中に0.5mmol/l IPTG(イソプロピル-β-D-チオガラクトシド)およびX-Gal(30 μg/ml, 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)で選択を行なった。

形質転換頻度 $1.7 \times 10^8$  cfu/ml(「コロニー形成単位」 生存細胞)では、実質的にすべてのコロニーがHindIII「インサート」を保持していた。

### 実施例7

(R)特異的アミドヒドロラーゼ遺伝子に関するクレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1K17遺伝子ライブラリーのスクリーニング

H. Kullaら(Arch. Mikrobiol., 135, 1983, 1-7)の記載とおり、C源としての0.4%(v/v)グリセロール、唯一のN源としての0.2%(w/v)(R,S)-2,2-HTFMPAおよびプラスミドの安定化のためのアンピシリン(5 μg/ml)を用いて、ハイブリッドプラスミド(HindIII「インサート」)を保持するコロニーを、最小培地寒天上でのその増殖能に関して調べた。該プラスミド中のDNA「インサート」上に無傷アミドヒドロラーゼ遺伝子sadを含有するクローンのみが、N源として(R,S)-HTFMPAを利用しこれを所望の(R)-酸に変換しこの最小培地上で増殖する能力を有していた。このようにして選択したすべてのクローンが、約2.73kbのHindIII「インサート」とベクターpBLUESCRIPT-KS+ R とのハイブリッドプラスミドを含有していた。

これにより、pPRS2aと称されるプラスミドを有する大腸菌(*E. coli*) XL1-Blue MRF' R 株を同定することが可能であり、該株からプラスミドpPRS2aを単離し、より詳しく特

10

20

30

40

50

徴づけた。

#### 実施例 8

クローン化HindIII断片上のアミドヒドロラーゼ遺伝子 (sad) の位置決定

##### 8.1 pPRS2aの制限地図

XhoI、DraII、SmaI、PstI、SalI、BamHIに関するpPRS2aの大まかな制限地図を、常法 (Current Protocols Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1987, 第2節) に従う制限分析により得た。該制限地図を図1に示す。

##### 8.2 アミドヒドロラーゼN末端ペプチド配列に基づく混合DNAオリゴマーの調製

クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) PRS1K17アミドヒドロラーゼN末端ペプチド配列の混合DNAオリゴマーの調製と、DNAシンセサイザーを使用するその合成とが、該遺伝暗号により可能になった。

10

L O N T - 4

5 ' C A K C A K C T N A C N G A R G A R A T G C A 3 '

A S H i s H i s L e u T h r G l u G l u M e t AS=アミノ酸配列

##### 8.3 プラスミドpPRS2aの制限断片の「サザンブロットハイブリダイゼーション」

種々の制限処理 (BamHI、SmaI、DraII、HindIII、EcoRI) の後にpPRS2aから得、アガロースゲル電気泳動 (0.6%) により分離したDNA断片を、公知の「サザンブロット法」 (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1987, 第2.9節以下参照) によりニトロセルロースに転写した。

また、該DNAオリゴマーの3'末端を、ジゴキシゲニンで標識した。「サザンブロット」のハイブリダイゼーションは、公知手法 (前記参照文献に記載) に従った。

20

N末端タンパク質配列に対応するヌクレオチドオリゴマーとのハイブリダイゼーションは、該ハイブリッドプラスミドpPRS2a上での1.44kbのSmaI/BamHI DNA断片または1.52kbのDraII/BamHI DNA断片の同定を可能にした。

##### 8.4 ヒドロラーゼ遺伝子 (sad) のサブクローニング

クレブシエラ・オキシトカ (Klebsiella oxytoca) PRS1K17からの (R) 特異的アミドヒドロラーゼをコードする1.52kbのDraII/BamHI DNAまたは1.91kbのPstI/BamHI DNA断片を、等しく消化されたベクターDNA pBLUESCRIPT-KS+ R 中に挿入した。

1.52kbのDraII/BamHI DNA断片を含有するベクターpBLUESCRIPT-KS+ R を、ハイブリッドプラスミドpPRS7と称することにした。1.91kbのPstI/BamHI DNA断片を含有するベクターpBLUESCRIPT-KS+ R を、ハイブリッドプラスミドpPRS4と称することにした。

30

##### 8.5 ヒドロラーゼ遺伝子 (sad) の配列決定

前記8.3にも記載の1.44kbのSmaI/BamHI断片を、レーザー蛍光DNAシークエネーターを用いるSangerのジデオキシ法 (改変法) による蛍光配列決定に付した。このようにして、配列番号1と称されるヌクレオチド配列を決定し、それから、配列番号2として別々に示すアミドヒドロラーゼのアミノ酸配列を導き出した。

#### 実施例 9

(R)-アミドヒドロラーゼクローンの活性の測定

該活性の測定は、実施例4.2に記載されているのと同様にして行なった。

実例として、大腸菌 (E. coli) /pPRS1bおよび大腸菌 (E. coli) /pPRS2aでの結果を表2に示す。

40

クローン	ヒドロラーゼ活性		時間 (時間)
	(R)-アミド g/l	(S)-アミド g/l	
E. coli XL1-Blue MRF'®/ pPRS1b (EcoRI クローン)	5.35	5.92	0
E. coli XL1-Blue MRF'®/ pPRS1b (EcoRI クローン)	0.00	5.84	4
	初期活性 (37°C)0.29g/l/ 時間/OD <sub>650nm</sub>		
E. coli XL1-Blue MRF'®/ pPRS2a (HindIII クローン)	5.66	5.92	0
E. coli XL1-Blue MRF'®/ pPRS2a (HindIII クローン)	0.00	6.20	8
	初期活性 (37°C)0.13g/l/ 時間/OD <sub>650nm</sub>		

10

20

## 実施例10

## 酵素の精製および酵素の特徴づけ

## 10.1 酵素の精製

精製中、該活性画分を比色定量により測定した。ついで無細胞抽出物および純粋な酵素の活性を、GC法で測定した。クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1細胞 (200ml, 100mMリン酸緩衝液 (pH7.5) 中OD<sub>650</sub>=21) を、19000psi (1309bar) のフレンチプレスに3回通すことにより破壊した。ベンゾナーゼ (1μl × 30ml抽出物<sup>-1</sup>) を加え、ついで該抽出物を100000 × gで15分間遠心分離した。該上清 (2.94mg × ml<sup>-1</sup>) を80 °Cで10分間加熱し、沈殿したタンパク質をついで遠心分離で除去した。該上清 (170ml, 0.83mg × ml<sup>-1</sup>) を、予め50mMリン酸緩衝液 (pH7.5; 緩衝液A) で平衡化したHiLoad Q-Sepharose 26/10クロマトグラフィーカラム (Pharmacia) に適用した。緩衝液A 130mlを使用して、該カラムから未結合タンパク質を溶出した。ついで直線勾配 (500ml; 緩衝液A中1M NaClから0M NaCl) を得、流速を2.5ml × 分<sup>-1</sup>とした。5mlの画分を集め、活性に関して試験した。最も活性な画分 (30~37; 40ml) を合わせ、限外濾過により7.5mlに濃縮し、ついでゲル濾過クロマトグラフィー (Sephadex G-25M, PD 10, Pharmacia) により該緩衝液を10mMリン酸緩衝液 (pH7.5) と交換した。ついで該活性画分を、10mMリン酸緩衝液で平衡化されているヒドロキシアパタイトカラム (5ml; Bio-Scale CHT1, BioRad) に適用した。1mlの画分を、勾配 (90ml; 0.5mMリン酸緩衝液から10mMリン酸緩衝液, pH7.5) を用いて流速2.0ml × 分<sup>-1</sup>で集め、活性に関して試験した。画分17~25および32~34で活性が示された。画分19ならびに画分33および34のタンパク質 (Mr 37000) は、SDS-PAGEによれば純粋であった。画分20のタンパク質は、95%を超える純度を示した。画分20~25を合わせ、200μlまで濃縮し、ついでゲル濾過クロマトグラフィーカラム (Superose 12; Pharmacia) に適用した。SDS-PAGEは、画分23~26が純粋であることを示した。

30

40

## 10.2 タンパク質の配列決定

N末端のアミノ酸をウエスタンブロット法により得、ついで該タンパク質をトリプシンで消化し、該ペプチドをHPLCで単離し、配列決定した。

- N 末端: Met Lys Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala  
Lys Arg Gly Val Gly Ala Ser Arg Lys Pro  
(配列番号3)
- T3: Val Tyr Trp Ser Lys (配列番号4)
- T4: Lys Pro Val Thr His His Leu Thr Glu Glu  
Met Gln Lys (配列番号5)
- T5: Tyr Thr Val Gly Ala Met Leu Asn Lys  
(配列番号6) 10
- T6A: Met Glu Asn Ala Glu Asn Ile Met Ser Ile  
Gly Ser Ala Arg (配列番号7)
- T7: Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys  
(配列番号8)
- T8: Met Pro Phe Leu Asn Pro Gln Asn Gly Pro  
Ile Met Val Asn Gly Ala Glu Lys  
(配列番号9) 20
- T9-2: Asp Ala Phe Glu Gly Ala Ile Asn Ser Glu  
Gln Asp Ile Pro Ser Gln Leu Leu Lys  
(配列番号10)
- T9-2: Glu Phe His Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Ser  
Thr Pro Val Leu Thr Ile Glu Pro Gly Asp  
Arg (配列番号11) 30
- T11: Leu Phe Ile Gly Asp Ala His Ala Glu Gln  
Gly Asp Gly Glu Ile Glu Gly Thr Ala Val  
Glu Phe Ala (配列番号12)
- T13-1: Gly Asp Val Leu Ala Val Tyr Ile Glu Ser  
Met Leu Pro Arg (配列番号13) 40
- T13-2: Gly Val Asp Pro Tyr Gly Ile Glu Ala Met  
Ile Pro His Phe Gly Gly Leu Thr Gly Thr  
Asp Leu Thr Ala Met Leu Asn Asp Gln Leu  
Gln Pro Lys (配列番号14)

### 10.3 酵素の特徴づけ

該アミダーゼを特徴づけるために、熱処理した無細胞抽出物を使用した。クレブシエラ・オキシトカ (*Klebsiella oxytoca*) PRS1K17 (DSM 11623) ( $OD_{650}=160$ ) の細胞を、19000

psi (1309bar) のフレンチプレスに3回通すことにより破壊した。ベンゾナーゼ (1 μl × 30ml 抽出物<sup>-1</sup>) を加え、ついで該抽出物を20000 × gで1時間遠心分離した。該上清 (約20 mg × ml<sup>-1</sup> タンパク質) を70 °Cで10分間加熱し、沈殿したタンパク質をついで遠心分離で除去した。該上清 (約2.0mg × ml<sup>-1</sup>) を、5.0mg × ml<sup>-1</sup> タンパク質まで濃縮し、ついで -20 °Cで保存した。この熱処理により、望まないタンパク質の約90%が除去された。0.5mg × ml<sup>-1</sup> のタンパク質濃度まで、反応速度は該タンパク質濃度と正比例した。したがって、通常、0.2mg × ml<sup>-1</sup> のタンパク質濃度を試験に用いた。最適pHを決定するためには、(R,S)-2,2-HTFMPA (基質) の濃度を0.5% (32mM)、温度を40 °Cとした。表4に記載の緩衝液をこの試験で使用した。

表4

緩衝液	pH
100mM MES	6.5
100mM HEPES	7.0; 7.5
50mM リン酸緩衝液	8.0; 8.5
50/100mM Tris 緩衝液	8.0; 8.5
50/100mM ホウ酸緩衝液	9.0; 9.5
50/100mM CAPS 緩衝液	10.0; 10.5; 11.0

該反応に対する温度の効果を、100mM CAPS緩衝液 (pH10.0) 中、0.5% (32mM) の基質濃度で判定した。基質濃度の効果は、100mM CAPS緩衝液 (pH10.0) 中、60 °Cで判定し、メタノールの効果は、100mM CAPS緩衝液 (pH10.0) 中、1% (64mM) の基質濃度で40 °Cおよび60 °Cで判定した。該反応のK<sub>m</sub>値は、BiosoftのEnzfitterプログラムを用いて決定した。図4は、最適pHを示す。最適pHは、9.5 ~ 10.5 (100mM CAPS緩衝液、基質濃度32mM) である。

図5は、ミカエリス - メンテン速度論を示す。(R)-2,2-HTFMPAのK<sub>m</sub>値は、32mM (100mM CAPS緩衝液 (pH10) 中、60 °C) である。

図6は、最適温度を示す。最適温度は、70 °C (100mM CAPS緩衝液、基質濃度32mM) である。

図7は、メタノールの効果を示す。該反応は、5 ~ 20%のメタノール濃度で阻害された。

#### 10.4 酵素の固定化

熱処理された無細胞抽出物を、Eupergit C

#### (Röhm GmbH)

を用いて固定化した。この目的には、Eupergit C (3.0g) を、1Mリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 中の熱処理された無細胞抽出物 (タンパク質濃度:51mg) に加えた。該混合物を、穏やかに攪拌しながら室温で90時間インキュベートした。該固定化酵素を、濾過により取り出し、100mMリン酸カリウム緩衝液 (pH8.0) 20mlで4回洗浄した。支持体に結合した酵素 (49mg) は、9.5gの固定化酵素 (新鮮重) を与え、これを、100mMリン酸カリウム緩衝液 (pH10.0) 中に4 °Cで保存した。該固定化酵素の活性および安定性を試験するために、小さなクロマトグラフィーカラムに、5g (25mgのタンパク質) をローディングした。ぜん動ポンプ (0.135ml × 分<sup>-1</sup>) を使用して、該基質 (100mM CAPS緩衝液 (pH10) 中の4%ラセミ体アミド100ml) をカラムとリザーバとの間で循環させた。全工程を水浴中で行なった。ある間隔で、分析用のサンプルを採取した。該酵素は、200時間後にも依然として活性であった。3つの生物変換 (それぞれ4gのラセミ体基質を使用し、1つは60 °Cで行ない、残りの2つは40 °Cで行なった) が、合計6gの(S)-アミドを与えた。反応の開始時に、非固定化酵素 (比活性 = 114 μg × 分<sup>-1</sup> × mgタンパク質<sup>-1</sup>) に匹敵 (41%) する固定化酵素 (比活性 = 47 μg × 分<sup>-1</sup> × mgタンパク質<sup>-1</sup>) を60 °Cで加えた。

#### 配列表

(1) 一般情報

(i) 出願人:

(A) 名前: L O N Z A A G

(B)通り：Muenchensteinerstrasse 38

(C)市：バーゼル

(E)国：スイス

(F)郵便番号：4002

(ii)発明の名称：(S)-または(R)-3,3,3-トリフルオロ-2-ヒドロキシ-2-メチルプロピオン酸の調製方法

(iii)配列の数：14

(iv)コンピュータ読取り可能な形態：

(A)媒体タイプ：フロッピーディスク

(B)コンピュータ：IBM・PCコンパチブル

(C)オペレーティングシステム：PC-DOS / MS-DOS

(D)ソフトウェア：Patent In リリース #1.0、バージョン#1.30(EPO)

(2)配列認識番号：1のための情報：

(i)配列特性：

(A)長さ：1442塩基対

(B)型：ヌクレオチド

(C)鎖の数：二本鎖

(D)トポロジー：環状

(ii)配列の種類：ゲノムDNA

(iii)ハイボセティカル：NO

(iv)アンチセンス：NO

(vi)起源：

(A)生物名：Klebsiella oxytoca

(B)株名：PRS1

(C)個体/単離クローン名：PRS1

(vii)直接の起源

(B)クローン名：pPRS2a

(ix)配列の特徴

(A)名称/記号：CDS

(B)存在位置：join(197..1181)

(D)他の情報：/産物 = 「アミダーゼ」

(xi)配列の記載：配列認識番号：1：

10

20

30

CCCGGAACT	CCATGTGGCC	GTGATCCTGG	TCGAGCAGGA	TATTGGGATG	ATCCAGCGGG	60	
CCGCACAGCG	CTGTGCGGTA	ATGGATAAAG	GCCTGGTTGT	AGAAACGCTG	ACCCAACAAC	120	
AGCTCTCTGA	TGATCTTTTA	ATCGGTGCTC	ATCTGGCTCT	GTAACATAAC	GCTATAAATT	180	
ACGTGGAGAA	TAACAT	ATG AAA	TGG TTG	GAA GAA	TCC ATG	ATG GCC	AAA
		Met Lys	Trp Leu	Glu Glu	Ser Ile	Met Ala	Lys
		1		5		10	
CGC GGT	GTT GGT	GCC GGG	CGT AAA	CCG GTA	ACG CAT	CAC CTG	ACG GAA
Arg Gly	Val Gly	Ala Gly	Arg Lys	Pro Val	Thr His	His Leu	Thr Glu
	15			20		25	
GAA ATG	CAA AAA	GAG TTT	CAT TAC	ACC ATT	GGC CCT	TAT TCC	ACA CCC
Glu Met	Gln Lys	Glu Phe	His Tyr	Thr Thr	Ile Gly	Pro Tyr	Ser Thr
	30		35			40	
GTC CTG	ACC ATC	GAA CCC	GGT GAC	CGG ATT	ATT GTC	GAC ACT	CGA GAT
Val Leu	Thr Ile	Glu Pro	Gly Asp	Arg Arg	Ile Ile	Val Asp	Thr Arg
	45		50			55	
GCT TTT	GAA GGT	GCT ATC	AAT TCG	GAA CAG	GAT ATT	CCG AGC	CAG TTG
Ala Phe	Glu Gly	Ala Ile	Asn Ser	Glu Gln	Asp Ile	Pro Ser	Gln Leu
	60		65		70		75
CTA AAA	ATG CCC	TTT CTC	AAC CCA	CAA AAC	GGA CCG	ATC ATG	GTC AAT
Leu Lys	Met Pro	Phe Leu	Asn Pro	Gln Asn	Gly Pro	Ile Met	Val Asn
		80		85			90
GGC GCG	GAG AAA	GGT GAT	GTG CTC	GCT GTC	TAT ATC	GAA TCC	ATG TTG
Gly Ala	Glu Lys	Gly Asp	Val Leu	Ala Val	Tyr Ile	Glu Ser	Met Leu
	95		100			105	
CCC CGC	GGC GTT	GAT CCC	TAC TGC	GGC ATC	TGC GCC	ATG ATT	CCG CAT
Pro Arg	Gly Val	Asp Pro	Tyr Gly	Ile Ile	Cys Ala	Met Ile	Pro His
	110		115			120	
GGC GGA	CTG ACC	GGG ACC	GAC CTG	ACG GCC	ATG CTC	AAT GAT	CCG CTG
Gly Gly	Leu Thr	Gly Thr	Asp Leu	Thr Thr	Ala Met	Leu Asn	Asp Pro
	125		130			135	
CCA GAA	AAG GTG	CGC ATG	ATT AAA	CTC GAC	AGT GAA	AAG GTC	TAC TGG
Pro Glu	Lys Val	Arg Met	Ile Lys	Leu Leu	Asp Ser	Glu Lys	Val Tyr
	140		145		150		155
AGC AAA	CGC CAT	ACG CTT	CCC TAT	AAA CCC	CAT ATT	GGC ACC	TTG AGC
Ser Lys	Arg His	Thr Leu	Pro Tyr	Lys Pro	His Ile	Gly Thr	Leu Ser
		160		165		170	
GTA TCG	CCA GAA	ATT GAC	TCA ATC	AAT TCA	CTG ACG	CCA GAC	AAT CAC
Val Ser	Pro Glu	Ile Asp	Ser Ile	Asn Ser	Leu Thr	Pro Asp	Asn His
	175			180		185	
GGC GGG	AAT ATG	GAT GTG	CCG GAT	ATA GGA	CCA CCA	GGG AGT	ATT ACC
Gly Gly	Asn Met	Asp Val	Pro Asp	Ile Ile	Gly Pro	Gly Ser	Ile Thr
	190		195			200	
CTG CCG	GTA CGT	GCG CCT	GGA GGC	CGC CTG	TTT ATT	GGT GAT	GCC CAT
Leu Pro	Val Arg	Ala Pro	Gly Gly	Arg Arg	Leu Phe	Ile Gly	Asp Ala
	205		210		215		
GCT TGT	CAG GGT	GAT GGT	GAG ATT	TGC GGG	ACC GCA	GTA GAG	TTT GCC
Ala Cys	Gln Gly	Asp Gly	Glu Ile	Cys Gly	Thr Thr	Ala Val	Glu Phe
	220		225		230		235
TCA ATC	ACC ACC	ATC AAA	GTC GAT	TTG ATC	AAG AAC	TGG CAG	CTT TCC
Ser Ile	Thr Thr	Ile Lys	Val Asp	Leu Leu	Ile Lys	Asn Trp	Gln Leu
		240		245		250	
TGG CCA	CGA ATG	GAG AAT	GCC GAA	AAT ATT	ATG AGT	ATT GGC	AGT GCA
Trp Pro	Arg Met	Glu Asn	Ala Glu	Asn Ile	Met Ser	Ile Gly	Ser Ala
	255			260		265	

10

20

30

40

CGT CCG CTG GAG GAT GCG ACG CGA ATT GCA TAT CGC GAC TTA ATT TAC	1045
Arg Pro Leu Glu Asp Ala Thr Arg Ile Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Tyr	
270 275 280	
TGG CTG GTA GAA GAC TTT GGC TTC GAA CAA TGG GAT GCC TAC ATG CTT	1093
Trp Leu Val Glu Asp Phe Gly Phe Glu Gln Trp Asp Ala Tyr Met Leu	
285 290 295	
CTG AGT CAA TGC GGC AAA GTG CCG CTG GGC AAC ATG GTC GAC CCC AAA	1141
Leu Ser Gln Cys Gly Lys Val Arg Leu Gly Asn Met Val Asp Pro Lys	
300 305 310 315	
TAC ACC GTT GGC GCG ATG CTG AAC AAA AAC CTG TTA GTT TAGTAGGAAT	1190
Tyr Thr Val Gly Ala Met Leu Asn Lys Asn Leu Leu Val	
320 325	
AACTAACCGG TGAACATTAC CCGGATGTAG ATCGGGGTAA TGTGTAAGTT CAAACAATCG	1250
CTATTTTAA CAGCTAAGC AGGTGCATAT GGGGCCAGAT ACACCCATCA ATATTGGTTT	1310
ACTTTACTCC TTCAGCGGAG TGACGGCGGC ACAAGAGTTG TCACAATGGC GCGGAGCAAC	1370
CCAGGCTATT GCCGAAATTA ATCAAAATGG CGGCATCAAC GGCAGACCAC TCAATGCAAT	1430
TCATTTGGAT CC	1442

10

(2) 配列認識番号：2のための情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：328アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(D) トポロジー：直鎖状

20

(ii) 配列の種類：タンパク質

(xi) 配列の記載：配列認識番号：2：

Met Lys Trp Leu Glu Glu Ser Ile Met Ala Lys Arg Gly Val Gly Ala  
 1 5 10  
 Gly Arg Lys Pro Val Thr His His Leu Thr Glu Glu Met Gln Lys Glu  
 20 25 30  
 Phe His Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Ser Thr Pro Val Leu Thr Ile Glu  
 35 40 45  
 Pro Gly Asp Arg Ile Ile Val Asp Thr Arg Asp Ala Phe Glu Gly Ala  
 50 55 60  
 Ile Asn Ser Glu Gln Asp Ile Pro Ser Gln Leu Leu Lys Met Pro Phe  
 65 70 75 80  
 Leu Asn Pro Gln Asn Gly Pro Ile Met Val Asn Gly Ala Glu Lys Gly  
 85 90 95  
 Asp Val Leu Ala Val Tyr Ile Glu Ser Met Leu Pro Arg Gly Val Asp  
 100 105 110  
 Pro Tyr Gly Ile Cys Ala Met Ile Pro His Phe Gly Gly Leu Thr Gly  
 115 120 125  
 Thr Asp Leu Thr Ala Met Leu Asn Asp Pro Leu Pro Glu Lys Val Arg  
 130 135 140  
 Met Ile Lys Leu Asp Ser Glu Lys Val Tyr Trp Ser Lys Arg His Thr  
 145 150 155 160  
 Leu Pro Tyr Lys Pro His Ile Gly Thr Leu Ser Val Ser Pro Glu Ile  
 165 170 175  
 Asp Ser Ile Asn Ser Leu Thr Pro Asp Asn His Gly Gly Asn Met Asp  
 180 185 190  
 Val Pro Asp Ile Gly Pro Gly Ser Ile Thr Tyr Leu Pro Val Arg Ala  
 195 200 205  
 Pro Gly Gly Arg Leu Phe Ile Gly Asp Ala His Ala Cys Gln Gly Asp  
 210 215 220  
 Gly Glu Ile Cys Gly Thr Ala Val Glu Phe Ala Ser Ile Thr Thr Ile  
 225 230 235 240  
 Lys Val Asp Leu Ile Lys Asn Trp Gln Leu Ser Trp Pro Arg Met Glu  
 245 250 255  
 Asn Ala Glu Asn Ile Met Ser Ile Gly Ser Ala Arg Pro Leu Glu Asp  
 260 265 270  
 Ala Thr Arg Ile Ala Tyr Arg Asp Leu Ile Tyr Trp Leu Val Glu Asp  
 275 280 285  
 Phe Gly Phe Glu Gln Trp Asp Ala Tyr Met Leu Leu Ser Gln Cys Gly  
 290 295 300  
 Lys Val Arg Leu Gly Asn Met Val Asp Pro Lys Tyr Thr Val Gly Ala  
 305 310 315 320

10

20

30

40

Met Leu Asn Lys Asn Leu Leu Val  
325

(2) 配列認識番号：3のための情報：

(i) 配列特性：

(A) 長さ：20アミノ酸

(B) 型：アミノ酸

(C) 鎖の数：不明

(D) トポロジー：不明

(ii) 配列の種類：ペプチド

(vi) 起源：

50





( 2 ) 配列認識番号 : 1 1 のための情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 2 1 アミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 不明

( D ) トポロジー : 不明

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( vi ) 起源 :

( B ) 菌株 : P R S 1

( C ) 個体 / 単離クローン名 : P R S 1

10

( xi ) 配列の記載 : 配列認識番号 : 1 1 :

Glu Phe His Tyr Thr Ile Gly Pro Tyr Ser Thr Pro Val Leu Thr Ile  
1 5 10 15

Glu Pro Gly Asp Arg  
20

( 2 ) 配列認識番号 : 1 2 のための情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 2 3 アミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 不明

20

( D ) トポロジー : 不明

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( vi ) 起源 :

( B ) 菌株 : P R S 1

( C ) 個体 / 単離クローン名 : P R S 1

( xi ) 配列の記載 : 配列認識番号 : 1 2 :

Leu Phe Ile Gly Asp Ala His Ala Glu Gln Gly Asp Gly Glu Ile Glu

1 5 10 15

Gly Thr Ala Val Glu Phe Ala  
20

30

( 2 ) 配列認識番号 : 1 3 のための情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 1 4 アミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 不明

( D ) トポロジー : 不明

( ii ) 配列の種類 : ペプチド

( vi ) 起源 :

( B ) 菌株 : P R S 1

40

( C ) 個体 / 単離クローン名 : P R S 1

( xi ) 配列の記載 : 配列認識番号 : 1 3 :

Gly Asp Val Leu Ala Val Tyr Ile Glu Ser Met Lau Pro Arg  
1 5 10

( 2 ) 配列認識番号 : 1 4 のための情報 :

( i ) 配列特性 :

( A ) 長さ : 3 3 アミノ酸

( B ) 型 : アミノ酸

( C ) 鎖の数 : 不明

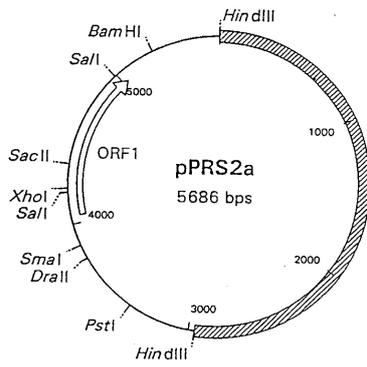
( D ) トポロジー : 不明

50



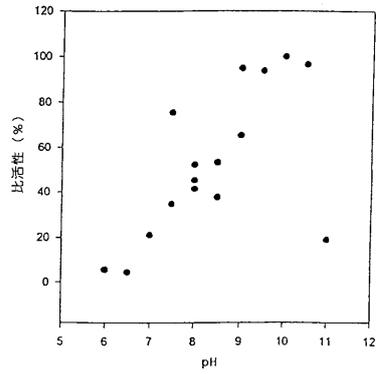
【 図 3 】

Fig.3



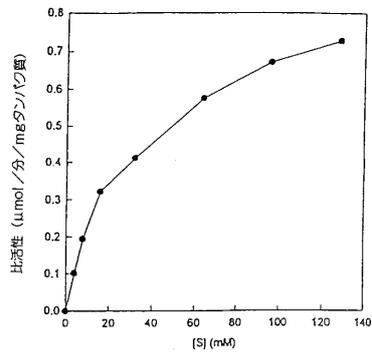
【 図 4 】

Fig.4



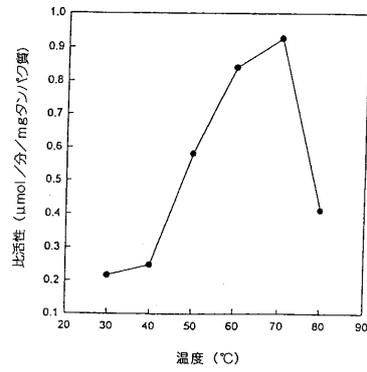
【 図 5 】

Fig.5



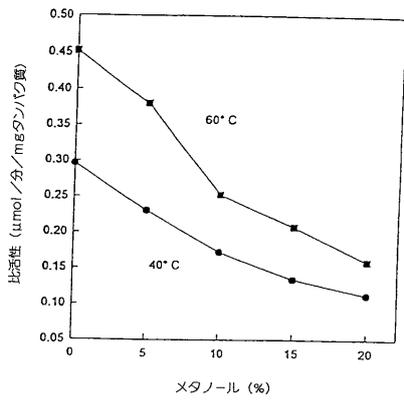
【 図 6 】

Fig.6



【 図 7 】

Fig.7



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
 C 1 2 R 1/38 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 R 1:07  
 C 1 2 N 15/00 Z N A A  
 C 1 2 R 1:38

微生物の受託番号 DSM 11010  
 微生物の受託番号 DSM 11344  
 微生物の受託番号 DSM 11350  
 微生物の受託番号 DSM 11351  
 微生物の受託番号 DSM 11354  
 微生物の受託番号 DSM 11355

(74)代理人 100109830  
 弁理士 福原 淑弘

(74)代理人 100095441  
 弁理士 白根 俊郎

(74)代理人 100084618  
 弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100103034  
 弁理士 野河 信久

(74)代理人 100092196  
 弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100100952  
 弁理士 風間 鉄也

(72)発明者 ブリーデン、バルター  
 スイス国、シーエイチ 3 9 0 2 グリス、グルンドビールシュトラーセ 9

(72)発明者 ノーグトン、アンドリュウ  
 スイス国、シーエイチ 3 9 3 0 ビスプ、バインガルテンベーク 1 6

(72)発明者 ロピンス、カレン  
 スイス国、シーエイチ 3 9 3 0 ビスプ、セント・マルティニシュトラーセ 3

(72)発明者 シャウ、ニコラス  
 スイス国、シーエイチ 3 9 3 0 ビスプ、バインガルテンベーク 1 4

(72)発明者 テインシェルト、アンドレアス  
 スイス国、シーエイチ 3 9 0 0 ブリク、クローネンガッセ 4

(72)発明者 ツィンマーマン、トーマス  
 スイス国、シーエイチ 3 9 0 4 ナタース、フルカシュトラーセ 9

審査官 村上 騎見高

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/00 - 15/90

CA(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

SwissProt/PIR/GeneSeq

PubMed