

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭62-40288

⑬ Int. Cl. 4

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)2月21日

C 12 N 9/02
// (C 12 N 9/02
C 12 R 1:785)
(C 12 N 9/02
C 12 R 1:845)

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑮ 発明の名称 カルボニルリダクターゼならびにその製造方法

⑯ 特 願 昭60-179775

⑰ 出 願 昭60(1985)8月14日

⑱ 発 明 者 山 田 秀 明 京都市左京区松ヶ崎木ノ本町19-1

⑲ 発 明 者 清 水 昌 京都市中京区西ノ京伯楽町14

⑳ 発 明 者 畑 啓 之 加古川市上荘町国包189-1

㉑ 出 願 人 製鉄化学工業株式会社 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

明 細 書

1. 発明の名称

カルボニルリダクターゼならびにその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) カルボニル基を NADPH の存在下に還元するカルボニルリダクターゼ。

(2) カルボニル基が共役ポリケトンのものである特許請求の範囲(1)記載のカルボニルリダクターゼ。

(3) 1モルのカルボニル基と1モルの NADPH より、1モルの S 配置アルコールおよび1モルの NADP⁺ を生成する特許請求の範囲(1)記載のカルボニルリダクターゼ。

(4) 至適 pH が 6~7 である特許請求の範囲(1)記載のカルボニルリダクターゼ。

(5) 30℃、10分間の保持条件において比較的安定な pH 範囲が 6 以上である特許請求の範囲(1)記載のカルボニルリダクターゼ。

(6) ゲル透法により測定した分子量が 54000 ± 2000 である特許請求の範囲(1)記載のカルボニルリダクターゼ。

(7) ムコール (Mucor) 属または、リゾプス (Rhizopus) 属に属するカルボニルリダクターゼ生産菌を栄養培地で培養して菌体内にカルボニルリダクターゼを蓄積せしめ、該菌体からカルボニルリダクターゼを採取することを特徴とするカルボニルリダクターゼの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

〔発明の目的〕

(産業上の利用分野)

本発明は、ポリケトン化合物に特異的に作用して、その構成単位であるカルボニル基の還元により、S 配置のアルコールを与えるカルボニルリダクターゼおよびその製造方法に関する。

ポリケトン立体的に還元して光学活性アルコールとする反応は、農業、医薬等の合成に有用である。その一例としては、ケトペントラクト

ンを還元して得られるR-ペントラクトンは、ビタミンであるペンタエン酸、ペンテチン等の前駆体である。その対掌体のS-ペントラクトンは農業である菊酸の前駆体である〔テトラヘドロンレターズ (Tetrahedron Letters) 1976, 1979〕また2位置換シクロペンタン-1, 3, 4-トリオンより得られるR配置アルコールは、プロスタグランジンの前駆体として有用である〔ジャーナルオブザアメリカンケミカルソサエティ (J. Am. Chem. Soc.) 97, 865 ~ 874 (1975)〕

(従来の技術)

しかしながらポリケトン還元して、R配置のアルコールを与える酵素としては、現在までにWilken等によるケトペントラクトンリダクターゼ〔ジャーナルオブバイオロジカルケミストリー (J. Biol. Chem.) 249, 4689~4695 (1974)〕同 250, 2311~2314 (1975)等〕等、若干の酵素が知られるのみであり、S配置アルコールを与える酵素についての報告はいま

でない。

〔発明の構成〕

(問題を解決するための手段)

このような状況に鑑み本発明者等は、S配置アルコールを与えるカルボニルリダクターゼを得る目的で、細菌、乳酸菌、放線菌、カビ、酵母、担子菌のタイプカルチャーはもとより、土壌、植物、活性汚泥等より得られた多数の菌株の粗製カルボニルリダクターゼ含有液 (cell-free extract) を調製し、その蛋白含有量とカルボニルリダクターゼ活性、さらに生成するアルコールのR、S体の比率を、ポリケトンとしてケトペントラクトンを用い、得られるペントラクトンをD-クロル炭酸メンチルによりジアステレオマーとした後、ガスクロマトグラフィーで分析する方法〔アナリティカルバイオケミストリー (Anal. Biochem.) 112, 9~16 (1981)〕によりスクリーニングを進めた。その結果、わずかにムコール属またはリゾプス属に属する菌株が主にS配置のA

ルコールを与えることを見出し本発明に至った。

本発明の酵素は広い基質特異性を持っているのでS配置アルコールの有効な合成手法となり得る。本発明者等が先に出願した酵素(特願昭59-46139)と合わせると所望の立体配置のアルコールを合成することができ、有効性は、さらに増大する。

すなわち、本発明の酵素はR配置のアルコールを与える前記本発明者等の発明酵素(特願昭59-46139)と合わせて、有機合成の強力な武器となる。

本発明の要旨は、カルボニル基をNADPHの存在下に還元するカルボニルリダクターゼと、該物質を得る方法がムコール属、リゾプス属のいずれかに属し、菌体内にS配置アルコールを与えるカルボニルリダクターゼを産生する能力を有する微生物を、当該生物菌体栄養培地で培養して、菌体内にカルボニルリダクターゼを蓄積せしめ、次いで当該菌体よりカルボニルリダクターゼを採取することを特徴とするカルボニルリダクターゼの製造

方法である。

本発明においてカルボニルリダクターゼ産生菌として用いられる微生物は、上記の属に属し菌体内にカルボニルリダクターゼを蓄積する能力を有するものであればいずれでもよく、その具体例としては、ムコールロウキシアヌス IF05773、ムコールアンビグウス IF06742、ムコールグロボサス IF06745、ムコールジャンセン IF06746、ムコールラセモサス IF04581、リゾプスシネンシス IF04768、リゾプスジャパニカス IF04801、リゾプスオリザエ IF03104等が挙げられる。また、これらの菌の天然および人工変異菌であってもポリケトンリダクターゼ産生能を有するかぎり同様に使用することができる。

本発明を実施するに当って、まず前記のカルボニルリダクターゼ産生菌の培養が行われる。培養方法は液体培養でも固体培養でもよいが、工業的にはカルボニルリダクターゼ産生菌を液体培地に

接種し、通気攪拌培養を行うのが有利である。培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられる炭素源、窒素源、無機塩、有機微量栄養源等を微生物の種類に応じて適宜選択すればよい。培養温度は菌が生育しカルボニルリダクターゼを産生する範囲内で適宜選択すればよく、一般的には15~50℃であり、培地のpHは通常3~10の範囲が適当である。培養時間は微生物の種類に応じて適宜選択すればよく、カルボニルリダクターゼの活性が最高に達する時期をみはからって適当な時期に培養を終了すればよい。かくして得られた培養物においてカルボニルリダクターゼは該微生物菌体内に蓄積されてくる。

このようにして得られた培養物よりカルボニルリダクターゼを抽出し、粗製のカルボニルリダクターゼ含有液を得るための方法は格別制限されるものではなく、その具体的な例として、例えば培養液を固液分離し得られた湿菌体を必要に応じてリン酸緩衝液やトリス塩酸緩衝液等に懸濁せしめ、

次いでリゾチーム処理、超音波処理、フレンチプレス処理、ガラスビーズ、石英砂等での磨砕処理、界面活性剤での溶菌処理等の菌体処理手段を適宜選択して組合せることにより菌体内よりカルボニルリダクターゼを抽出し、得られた抽出液より適宜な分離手段で残渣を除去することによって、cell-free extractが得られる。

次いでこのcell-free extractは、蛋白質、酵素等の単離、精製手段として公知の方法を用いることにより精製されたカルボニルリダクターゼを得ることができる。かかる単離、精製手段の具体例として、例えば硫酸分画法、イオン交換クロマトグラフィー法、吸着クロマトグラフィー法、ゲル濾過法等を挙げることができ、必要に応じて適宜組合せて用いられる。

かくして得られるカルボニルリダクターゼは前記反応を触媒する酵素であり、臨床検査用試薬、研究用試薬等としても有用である。

以下に実施例を挙げて本発明をさらに具体的に

説明する。

なお実施例中の%はとくに断りのないかぎり重量基準であり、またカルボニルリダクターゼの酵素活性測定法等の分析法は以下の通りである。

(1) 酵素活性測定法

320 μ M NADPH、200 mM リン酸カリ緩衝液(pH 7.5)を含む水溶液2.5 mlに酵素液5 μ lを加えて窒素雰囲気下30℃で3分間放置して、一定温度とした後、100 mM ケトペントラクトン溶液を10 μ l加えて反応を開始させ、340 nmの吸光初期減少をスペクトロメーター(日立 Model 200-10 Spectrometer)で測定することにより、酵素活性を測定した。カルボニルリダクターゼ酵素活性は、この条件下で1分間に1 μ molのNADPHを消費する酵素量を1単位(U)とする。

(2) 蛋白質の定量

Bovin serum albumin(BSA)を標準とするLowry法で定量する。

(3) S-ペントラクトンの定量

0.5 Mのリン酸カリ緩衝液0.8 mlに4.00 mgのNADPH(44.2 mM)とcell-free extract 0.2 mlを加え、そこに塩酸を含む水に溶解したケトペントラクトンの2 M溶液を2分毎に2 μ lずつ10回添加する方法を行わせた。ケトペントラクトンの添加終了後さらに30分間熟成して所定の方法で反応液を分析し、全生成ペントラクトンに占めるS-ペントラクトンの比率を求めた。なお、反応温度は30℃であった。

(4) 至適 pH

(1)の酵素活性測定法で用いた標準反応液を用い、pH 4.0~5.0の酢酸ソーダ-塩酸緩衝液、pH 6.0~8.0のリン酸カリ緩衝液、pH 7.0~9.0のトリス-塩酸緩衝液、pH 9.0~12.0のグリシン-苛性ソーダ緩衝液を用いて活性を測定し、その至適pHを求める。

(5) pH安定性

(4)の至適pH測定で用いた各pHの緩衝液に酵

業液を加えて30℃で10分間放置した後、カルボニルリダクターゼ活性の残存率を測定する。

(6) 至適温度

(1)の酵素活性測定法で用いた標準反応液を用い、温度を変化させて、酵素活性を測定する。

(7) 熱安定性

所定の温度で、10分間酵素液を処理し、その残存活性を測定する。

(8) Km値

ポリケトン化合物、NADPHに対するKm値を測定する。

実施例1

麦芽エキス5%、酵母エキス0.3%、寒天2%からなる寒天斜面培地(pH 6.0)で28℃、48時間培養したムコール アンピグウス IFO6742の1白金耳量を、麦芽エキス5%、酵母エキス0.3%からなり、pH 5.0に調整、加熱滅菌した液体培地5ml、3本に接種し、28℃で48時間振盪培養した。次に種菌用液体培地と同じ組成の加熱

滅菌した液体培地500mlを入れた2.5坂口フラスコ40本に前記培養液をそれぞれ接種し、28℃で48時間振盪培養した。培養終了後、培養液より尹過により菌体を得た。

次いで0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)800mlに菌体を懸濁後、超音波処理によりカルボニルリダクターゼを抽出し、尹過および遠心分離によって不溶物の除去を行い、得られた上澄液にまず60%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、生じた沈殿物を遠心分離で除去したのち、その上澄液にさらに硫酸アンモニウムを終濃度90%飽和になるように加え、カルボニルリダクターゼを沈殿せしめた。得られた沈殿物を0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)100mlに溶解し、次いでこの溶解液を0.1mMジチオスレイトールを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液(pH 7.4)で透析し、予め0.1mMジチオスレイトールを含む0.01Mトリス塩酸緩衝液で

平衡化したDEAE-セフアセルカラム(径5cm、長さ40cm)に通してカルボニルリダクターゼを吸収させ、同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液と0.5Mの塩化カリウムを溶解した同緩衝液とで濃度勾配を作り、徐々に塩化カリウム濃度を上げながらカルボニルリダクターゼを溶出させた。溶出されたカルボニルリダクターゼ活性画分を集め、70~100%飽和硫酸アンモニウムで沈殿してくるものを、0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)5mlに溶解し、さらにこの溶液に濃度が4Mとなるように食塩を加えた。この溶液を0.1mMジチオスレイトール、0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)および4M食塩よりなる溶液で平衡化したフェニルセファロースCL-4Bカラム(径1cm、長さ10cm)に通してカルボニルリダクターゼを吸着させ、同緩衝液で洗浄した後、同緩衝液(4M食塩)と食塩を含まない同緩衝液とで濃度勾配を作り、徐々に食塩濃度を下げながら、カルボニルリ

ダクターゼを溶出させた。溶出されたカルボニルリダクターゼ活性画分を集め、90%飽和硫酸アンモニウムで沈殿してくるものを2mlの0.1mMジチオスレイトールを含む0.02Mリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)に溶解し、同緩衝液で平衡化したセフアブックスG-75カラムにてゲル尹過を行い、カルボニルリダクターゼ活性画分を集め、90%飽和硫酸アンモニウムで沈殿してくるものを1mlの0.1mMジチオスレイトールと0.02Mのリン酸カリ緩衝液(pH 7.0)に溶解した。さらにBlue Sepharoseカラムを通し、カルボニルリダクターゼ製品2mgを得た。このものの比活性は、388U/mg、培養液からの収率は11.8%であった。

至適pHは6~7、至適温度は40℃であり、pH安定性は6以上、熱安定性は40℃以下、ケトペントラクトン、イサチンおよびNADPHに対するKm値は、それぞれ49.9μM、174μMおよび135μMであった。さらにアロキサン

第 1 表

2.5 mM, P-トルキノロン0.41 mM, アセナフチキノロン0.21 mM等、多くのポリケトンに対し親和性を示した。

本酵素を用いて所定の方法で反応すると、100% ee のS-パントラクトンが収率61.2%で得られた。

実施例 2

リゾプス シネンシス IFO4768を用いて実施例1と同様に行い、ポリケトンリダクターゼ標品3号を得た。

このものの比活性は、395 U/μg, cell-free extractからの収率は、19.6%でありその他の酵素的性質は実施例1の場合とほぼ同等であった。

実施例 3

酵素活性測定法において、実施例1で得た酵素10 mUを用い基質を種々変化させ、その初期還元速度を比べたのが第1表である。本酵素は広い基質特異性を持っていることが明らかである。

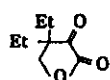
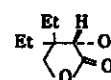
基 質	相対初期速度
ケトパントラクトン	100
P-ベンゾキノロン	220
キンヒドロロン	199
α-ナフトキノロン*	30
θ-ナフトキノロン*	54
d,l-カンファーキノロン	23
アセナフチキノロン**	29
フェナントラキノロン**	68
PQQ**	29
ジアセチル	10
デヒドロアスコルビン酸	3
1,2-シクロヘキサジオン	13
ニンヒドリン	29
アロキサソ	86
イサチン	130
1-メチルイサチン	82

* 1/2 濃度, ** 1/5 濃度

実施例 4

S-パントラクトンの定量において、実施例1で得た酵素200 mUを用い、基質を変化させて生成物を調べ、以下の結果を得た。いずれもS配位アルコールが得れた。なお、2級アルコールの絶対配位決定には、Horeauの方法〔アナリティカルレターズ(A analytical Letters) 6, 639 (1973)〕を用いた。

(3S)-ジヒドロ-4,4-ジエチル-3-ヒドロキシ-2(3H)-フランオン

基 質	生成物	収 率 (対NADPH)	$[\alpha]_D^{25}$ (MeOH)
		85%	+13.3°

CHN分析

C, 60.6%; H, 8.6%

NMRδ ppm
(CDCl₃)

0.83(Me, t, J=7.6 Hz, 3H), 0.91
(Me, t, J=7.6 Hz, 3H), 1.48(CH₂,
m, J=7.2 Hz, 4H), 3.94(CH₂, dd,
J₁=10.2 Hz, J₂=9.4 Hz, 2H),

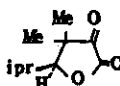
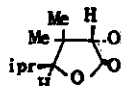
2.8(OH, bs, 1H)

IR(film) 3450(bd), 2980, 1785, 1485,
1195, 1120, 1010, 885cm⁻¹

MASS(m/e) 156, 86, 85(Base), 71, 55, 43,
40

(3S, 5S)-ジヒドロ-4,4-ジメチル-
5-(1-メチルエチル)-3-ヒドロキシ-2
(3H)-フランオン

基 質 生成物 収 率 $[\alpha]_D^{25}$ (MeOH)
(対NADPH)

		77%	-47.6°
---	--	-----	--------

CHN分析

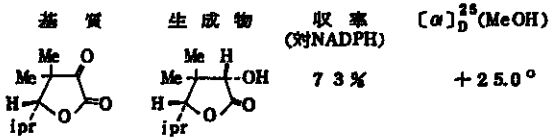
C, 62.8%; H, 9.2%

NMRδ ppm
(CDCl₃)

0.95(Me, d, J=6.8 Hz, 3H), 0.99
(Me, d, J=6.8 Hz, 3H), 1.09(Me,
s, 3H), 1.10(Me, s, 3H), 1.95
(H, m, 1H), 3.95(H, d, J=6.5 Hz,
1H), 4.05(H, s, 1H), 2.7(OH, bs,
1H)

IR(film) 3450(bd), 2975, 2940, 1775,
1475, 1225, 1120, 995, 975 cm^{-1}
MASS(m/e) 101, 86, 85(Base), 83, 73, 72,
57, 55, 44, 43, 40, 39

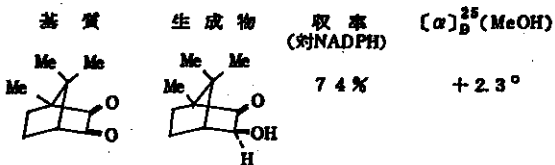
(3S, 5R) - ジヒドロ - 4,4 - ジエチル -
5 - (1 - メチルエチル) - 3 - ヒドロキシ - 2
(3H) - フラノン



CHN分析 C, 63.0%; H, 9.1%
NMR δ ppm (CDCl₃)
0.88 (Me, s, 3H), 0.92 (Me,
d, J=6.7Hz, 3H), 1.03 (Me,
d, J=6.7Hz, 3H), 1.21 (Me,
s, 3H), 1.87 (H, m, 1H),
3.57 (H, d, J=10.4Hz, 1H),
4.01 (H, s, 1H), 2.5 (OH, bs,
1H)

1H), 残り4Hは1.9付近(m),
1.6付近(m), 1.3付近(m)
IR(KBr) 3450(bd), 2960, 1755, 1460,
1400, 1380, 1320, 1295, 1105,
1080, 1020, 835 cm^{-1}
MASS(m/e) 168, 125, 95, 84, 83(Base),
69, 55, 43, 40, 39

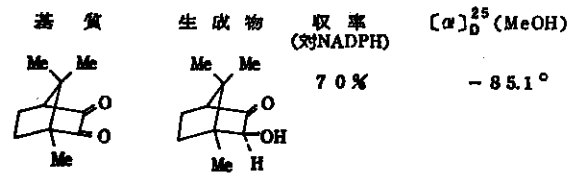
(1S, 3S, 4R) - 3 - ヒドロキシ - 1,7
7 - トリメチルビシクロ[2,2,1]ヘプタン - 2
- オン



CHN分析 C, 71.4%; H, 9.4%
NMR δ ppm (CDCl₃)
0.82 (Me, s, 3H), 0.87 (Me,
s, 3H), 0.95 (Me, s, 3H),
2.20 (H, dd, J=4.7Hz, 1H),

IR(KBr) 3410(bd), 2980, 2930, 2890,
1760, 1485 ~ 1440, 1400 ~
1200, 1180, 1150, 1020, 985
MASS(m/e) 101, 86, 85(Base), 83, 73, 72,
57, 55, 44, 43, 40, 39

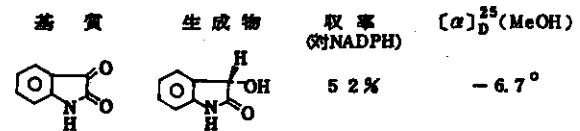
(1S, 3R, 4R) - 3 - ヒドロキシ - 4,7,
7 - トリメチルビシクロ[2,2,1]ヘプタン - 2
- オン



CHN分析 C, 71.3%; H, 9.2%
NMR δ ppm (CDCl₃)
0.85 (Me, s, 3H), 0.88 (Me,
s, 3H), 0.92 (Me, s, 3H),
2.02 (H, d, J=4.3Hz, 1H),
3.65 (H, s, 1H), 2.4 (OH, bs,
1H), 残り4Hは1.9付近(m),
1.7付近(m), 1.3付近(m)

IR(KBr) 3460(bd), 2960, 1745, 1480,
1460, 1400, 1380, 1110, 1085,
1005, 980 cm^{-1}
MASS(m/e) 168, 125, 95, 84, 83(Base), 69,
55, 43, 40, 39

(3S) - 2,3 - ジヒドロ - 3 - ヒドロキシイ
ンドール - 2 - オン

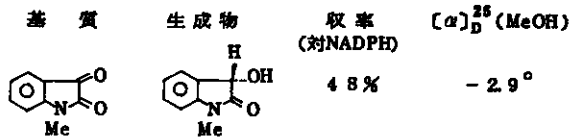


CHN分析 C, 64.6%; H, 4.3%; N, 9.6%
NMR δ ppm (CD₂COCD₂)
3.63 (H, s, 1H), 5.03 (OH,
bd, J=6.1Hz, 1H), 7.25-6.75
(aromatic H, 4H), 9.07 (NH,
bs, 1H)

特開昭62- 40288 (7)

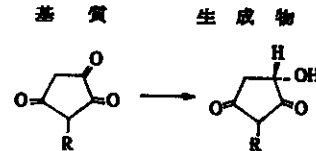
IR(KBr) 3440(bd), 1710, 1635, 1480,
1360, 1270, 1200, 1180, 1115,
750 cm^{-1}

MASS(m/e) 147, 119(Base), 93, 92, 64, 40
(3R)-2,3-ジヒドロ-3-ヒドロキシ-
1-メチルインドール-2-オン



CHN分析 C, 66.2%; H, 5.8%; N, 8.8%
NMR δ ppm (CDCl₃) 3.18 (Me, s, 3H), 3.52 (H, s, 1H), 5.01 (OH, s, 1H), 6.67-7.56 (aromatic H, 4H)
IR(KBr) 3420(bd), 1720, 1620, 1500, 1215, 760 cm^{-1}
MASS(m/e) 161, 133, 105, 104(Base), 92, 78, 63, 50, 44, 39

(4S)-2-(6-カーボメトキシヘキシル)-4-ヒドロキシシクロペンタン-1,3-ジオン
または、(4S)-2-(6-カーボメトキシ-cis-2-ヘキシル)-4-ヒドロキシシクロペンタン-1,3-ジオン



収率% (基質基準) $[\alpha]_D^{25}$

Rは-(CH₂)₆CO₂Me 79 -7.2° (MeOH)
または cis-CH₂CH=CH(CH₂)₃CO₂Me 64 -19.2° (CDCl₃)
生成物の物性値は、[ジャーナルオブザアメリカンケミカルソサエティ(J. Am. Chem. Soc.) 97, 865 ~ 874 (1975)]と一致した。

(発明の効果)

本発明のカルボニルリダクターゼは、新規の酵

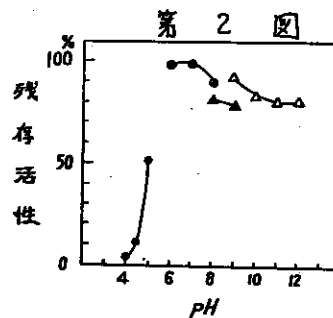
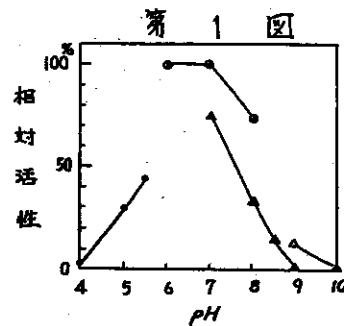
素であり、従来知られていた酵素とは逆の立体配置をもったアルコールを、カルボニル基の還元により与える。また本発明の酵素は広い基質特異性を持っているので、多くの有機化合物のカルボニル基を還元でき、有機合成試薬としても有用である。

4. 図面の簡単な説明

第1図は、本発明酵素の至適pH範囲を示すグラフ第2図は、本発明酵素の安定pH範囲(30℃, 10分)を示すグラフ,第3図は、本発明酵素の至適温度範囲を示すグラフ,第4図は、本発明酵素の安定温度範囲を示すグラフである。

出願人 製鉄化学工業株式会社

代表者 増田 裕治



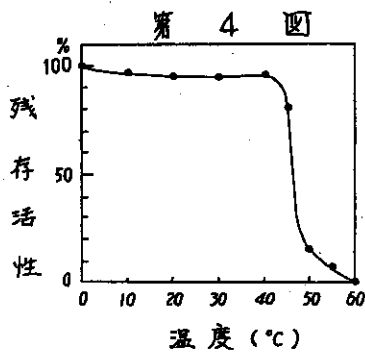
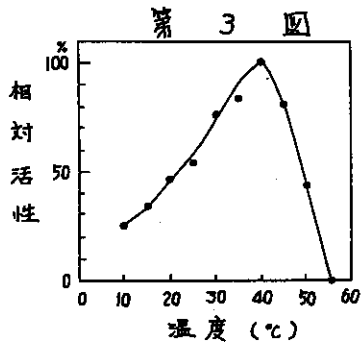
緩衝液: ● 酢酸ソーダ塩酸
○ リン酸ナリ
▲ トリスー塩酸
△ グリシン-酢酸ソーダ

特開昭62- 40288 (8)

手続補正書 (自発)

昭和60年9月24日

特許庁長官 宇賀 道郎 殿



1. 事件の表示

昭和60年特許願第179775号

2. 発明の名称

カルボニルリダクターゼならびにその製造方法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

〒675-01

住 所 兵庫県加古郡播磨町宮西346番地の1

名 称 製鉄化学工業株式会社

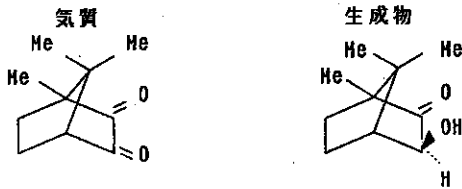
(TEL0794-37-2151)

代表者 増田 裕治

4. 補正の対象 明細書

5. 補正の内容

(1) 明細書第20頁第9行の式を以下のとおり補正する。



(2) 明細書第21頁第11行の式を以下のとおり補正する。

