

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-57192  
(P2004-57192A)

(43) 公開日 平成16年2月26日(2004.2.26)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62 Z N A	4 B O 2 4
// C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 6 4
(C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:06 )	C 1 2 R 1:06	
(C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
審査請求 未請求 請求項の数 15 O L (全 37 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-271293 (P2002-271293)	(71) 出願人	000002093 住友化学工業株式会社 大阪府大阪市中央区北浜4丁目5番33号
(22) 出願日	平成14年9月18日(2002.9.18)	(74) 代理人	100093285 弁理士 久保山 隆
(31) 優先権主張番号	特願2002-162693 (P2002-162693)	(74) 代理人	100113000 弁理士 中山 亨
(32) 優先日	平成14年6月4日(2002.6.4)	(74) 代理人	100119471 弁理士 榎本 雅之
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	伊藤 伸哉 富山県富山市文京町1-2-18
		(72) 発明者	脇田 龍平 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号住友化学工業株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを製造する方法を提供すること。

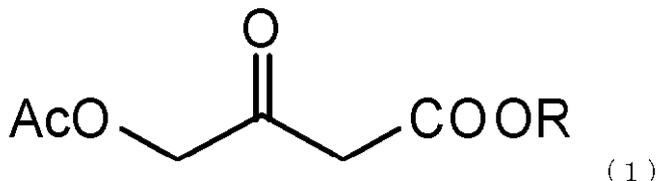
【解決手段】 4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法であって、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキシブタン酸エステルを、当該化合物の3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを採取する工程を有することを特徴とする製造方法等が提供可能になった。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

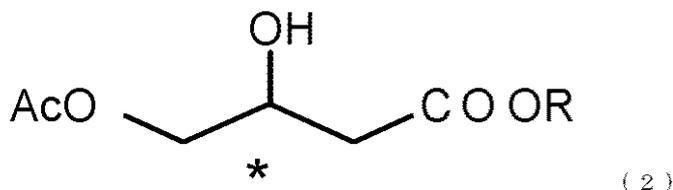
## 【請求項 1】

4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法であって、  
一般式 ( 1 )



10

( 式中、R は C 1 - C 8 アルキル基を表す。 )  
で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを、当該化合物の 3 位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した一般式 ( 2 )



20

( 式中、R は C 1 - C 8 アルキル基、\* は不斉炭素原子を示す。 )  
で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを採取する工程を有することを特徴とする製造方法。

## 【請求項 2】

一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が、前記能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

## 【請求項 3】

形質転換体が、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA を含有するプラスミドが導入されてなる形質転換体であることを特徴とする請求項 2 記載の製造方法。

30

## 【請求項 4】

形質転換体が大腸菌であることを特徴とする請求項 2 又は 3 記載の製造方法。

## 【請求項 5】

一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

40

## &lt; アミノ酸配列群 &gt;

- ( a ) 配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列
- ( b ) 配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列
- ( c ) 配列番号 2 又は 4 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列
- ( d ) 配列番号 2 又は 4 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エス

50

ルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列 ( e ) コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物由来の、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項 6】

一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

< アミノ酸配列群 >

( a ) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列

10

( b ) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( c ) 配列番号 2 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

( d ) 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

20

( e ) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項 7】

一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトンを還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。 < アミノ酸配列群 >

( a ) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列

( b ) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

30

( c ) 配列番号 4 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

( d ) 配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( e ) ペニシリウム属に属する微生物由来の、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒ

40

ドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

【請求項 8】

一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトンを還元する能力が、配列番号 1 で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 9】

一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトンを還元する能力が、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項 1 記載の製造方法。

【請求項 10】

50

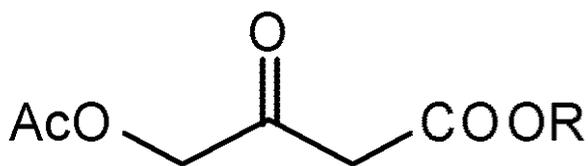
一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項11】

一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項12】

一般式(1)

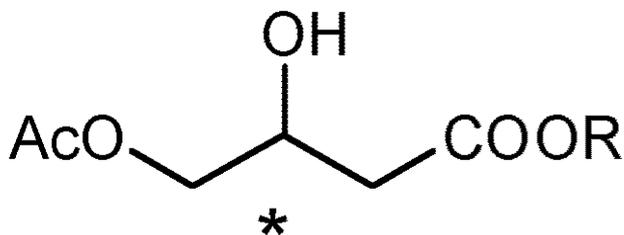


(1)

10

(式中、RはC1-C8アルキル基を表す。)

で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)



(2)

20

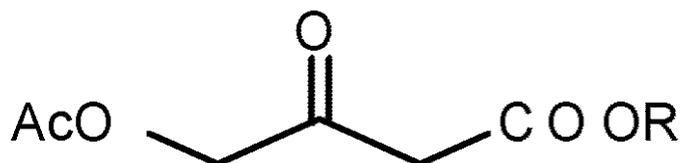
(式中、RはC1-C8アルキル基、\*は不斉炭素原子を示す。)

で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成させるための触媒としての、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の使用。

30

【請求項13】

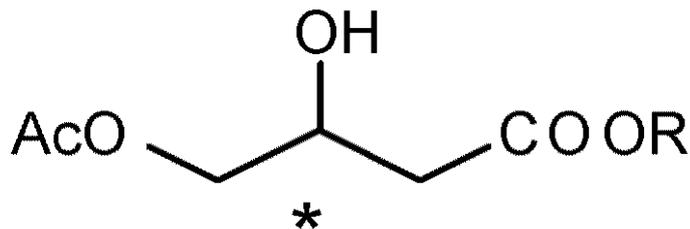
一般式(1)



(1)

(式中、RはC1-C8アルキル基を表す。)

で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)



(2)

40

(式中、RはC1-C8アルキル基、\*は不斉炭素原子を示す。)

で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成させるための触媒としての、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位に

50

あるケトン還元能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞の使用。

【請求項14】

一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の由来が、アルスロバクター属、ロドトルラ属、バシラス属、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、キャンデイダ属、コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物であることを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【請求項15】

前工程として、4-ハロ-3-オキソブタン酸エステルの4位にあるハロゲン原子をアセトキシ基に置換することにより一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを得る工程を付加的に有することを特徴とする請求項1記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法等に関する。

【0002】

【従来の技術及び発明が解決しようとする課題】

3,4-ジヒドロキシブタン酸の誘導体は医農薬中間体等として有用な化合物であり、例えば抗高脂血症剤等の鍵中間体として重要である(特許文献1参照)。

上記の誘導体を効率的に合成するには、4位のヒドロキシル基が保護された3,4-ジヒドロキシブタン酸の誘導体である4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルは極めて有用である。

このような4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを製造する方法としては、プロモニトリルオキサイドをアリルアルコールに付加させ、イソオキサゾリン化合物を構築した後、さらに3工程を経る方法による、合計4工程での製造方法が知られている(非特許文献1参照)が、より効率的又は簡便な方法が求められている。

【0003】

【特許文献1】

特許第3241723号公報(第2頁)

【0004】

【特許文献2】

特開平10-94399号公報

【0005】

【非特許文献1】

Tetrahedron Letters (1986) 4647

【0006】

【非特許文献2】

Journal of Molecular Catalysis B 6, 1999, 41

【0007】

【非特許文献3】

Appl. Environ. Microbiology 1997, 3783

【0008】

【非特許文献4】

Appl. Biol. Biotech 52, 1999, 386

【0009】

【課題を解決するための手段】

このような状況下、本発明者等は、4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法について鋭意検討した結果、一般式(1)

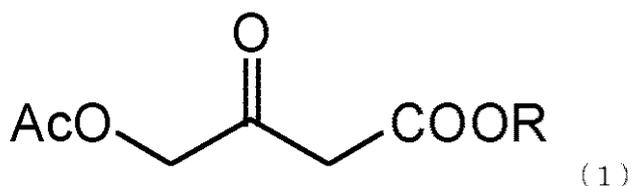
10

20

30

40

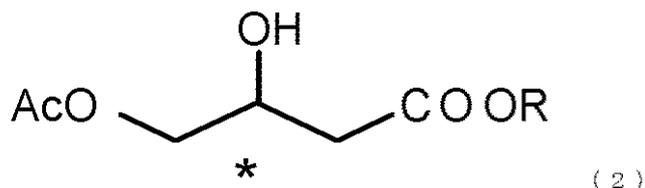
50



(式中、RはC1 - C8アルキル基を表す。)

で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを、当該化合物の3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した一般式(2)

10



(式中、RはC1 - C8アルキル基、\*は不斉炭素原子を示す。)

で示される4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを採取することにより、目的とする4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを効率的又は簡便に製造できることを見出し、本発明に至った。

20

【0010】

即ち、本発明は、

1. 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法であって、一般式(1)で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを、当該化合物の3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に作用させる工程、並びに生成した一般式(2)で示される4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを採取する工程を有することを特徴とする製造方法；

2. 一般式(1)で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が、前記能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

30

3. 形質転換体が、一般式(1)で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNAを含有するプラスミドが導入されてなる形質転換体であることを特徴とする前項2記載の製造方法；

4. 形質転換体が大腸菌であることを特徴とする前項2又は3記載の製造方法；5. 一般式(1)で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列

40

(b) 配列番号1又は3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式(1)で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号2又は4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2又は4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジентな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式(1)で示される4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列 (e) コリネバクテリウム属又はペニシリ

50

ウム属に属する微生物由来の、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列；

5. 一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号1で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

10

(c) 配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

(d) 配列番号2で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列；

20

6. 一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法<アミノ酸配列群>

(a) 配列番号3で示されるアミノ酸配列

(b) 配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(c) 配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

30

(d) 配列番号4で示される塩基配列からなるDNAに対し相補性を有するDNAとストリンジントな条件下でハイブリダイズするDNAの塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

(e) ペニシリウム属に属する微生物由来の、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列；

7. 一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、配列番号1で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

40

8. 一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、配列番号3で示されるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

9. 一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、配列番号2で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

10. 一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力が、配列番号4で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力であることを特徴とする前項1記載の製造方法；

50

1 1 . 一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成させるための触媒としての、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の使用 ;

1 2 . 一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成させるための触媒としての、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元する能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞の使用 ;

1 3 . 一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物の由来が、アルスロバクター属、ロドトルラ属、バシラス属、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、キャンデイダ属、コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物であることを特徴とする前項 1 記載の製造方法 ;

1 4 . 前工程として、4 - ハロ - 3 - オキソブタン酸エステルの 4 位にあるハロゲン原子をアセトキシ基に置換することにより一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを得る工程を付加的に有することを特徴とする前項 1 記載の製造方法 ;

等を提供するものである。

【 0 0 1 1 】

【 発明の実施の形態 】

以下、本発明について詳細に説明する。

本発明製造方法で用いられる酵素は、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素である ( 以下、本還元酵素と記すこともある。 ) 。このような酵素は、本還元酵素を産生する微生物等から通常の生化学的手法や遺伝子工学的な手法等を利用して調製することができる。例えば、本還元酵素を産生する微生物が形質転換体である場合には、当該形質転換体としては、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる DNA を含有するプラスミドが少なくとも導入されてなる形質転換体 ( 以下、本形質転換体と記すこともある。 ) 等をあげることができる。また、本還元酵素を産生する微生物が非形質転換体 ( 即ち、前記能力が人為的に付与されていないにも係わらず、予め当該能力を有する微生物 ) である場合には、当該非形質転換体としては、後述の実施例のように、市販の微生物又は土壌などから前記能力を指標にしてスクリーニングすることにより単離された微生物等があげられる。このような微生物の例としては、アルスロバクター属、ロドトルラ属、バシラス属、シュードモナス属、ストレプトマイセス属、キャンデイダ属、コリネバクテリウム属又はペニシリウム属に属する微生物等をあげることができる。

【 0 0 1 2 】

「一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力」の具体的な例としては、例えば、下記のアミノ酸配列群の中から選ばれるアミノ酸配列を有する酵素が持つ能力をあげることができる。

< アミノ酸配列群 >

( a 1 ) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列

( a 2 ) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列

( b 1 ) 配列番号 1 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 -

10

20

30

40

50

アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( b 2 ) 配列番号 3 で示されるアミノ酸配列において 1 若しくは複数のアミノ酸配列が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列であって、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( c 1 ) 配列番号 2 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

( c 2 ) 配列番号 4 で示される塩基配列がコードするアミノ酸配列

( d 1 ) 配列番号 2 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( d 2 ) 配列番号 4 で示される塩基配列からなる DNA に対し相補性を有する DNA とストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列を有し、かつ、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( e 1 ) コリネバクテリウム属に属する微生物由来の、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

( e 2 ) ペニシリウム属に属する微生物由来の、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルを還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素のアミノ酸配列

#### 【 0 0 1 3 】

本形質転換体を作製する際に用いられる、一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する酵素 ( 即ち、本還元酵素 ) のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子 ( 以下、本還元酵素遺伝子と記すこともある。 ) は、( 1 ) 天然に存在する遺伝子の中からクローニングされたものであってもよいし、( 2 ) 天然に存在する遺伝子であっても、このクローニングされた遺伝子の塩基配列において、その一部の塩基の欠失、置換又は付加が人為的に導入されてなる遺伝子 ( 即ち、天然に存在する遺伝子を変異処理 ( 部分変異導入法、突然変異処理等 ) を行ったもの ) であってもよいし、( 3 ) 人為的に合成されたものであってもよい。

#### 【 0 0 1 4 】

ここで、前記 ( b )、( b 1 ) 又は ( b 2 ) にある「アミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列」や前記 ( d )、( d 1 ) 又は ( d 2 ) にある「ストリンジентな条件下でハイブリダイズする DNA に対し相補性を有する DNA の塩基配列がコードするアミノ酸配列」には、例えば、配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列を有する酵素が細胞内で受けるプロセッシング、該酵素が由来する生物の種差、個体差、組織間の差異等により天然に生じる変異や、人為的なアミノ酸の変異等が含まれる。

前記 ( b )、( b 1 ) 又は ( b 2 ) にある「(アミノ酸が)欠失、置換若しくは付加(された)」(以下、総じてアミノ酸の改変と記すこともある。)を人為的に行う場合の手法としては、例えば、配列番号 1 又は 3 で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する DNA に対して慣用の部位特異的変異導入を施し、その後この DNA を常法により発現させる手法が挙げられる。ここで部位特異的変異導入法としては、例えば、アンバー変異を利用する方法 ( ギャップド・デュプレックス法、N u c l e i c A c i d s R e s . , 1 2 , 9 4 4 1 - 9 4 5 6 ( 1 9 8 4 ) )、変異導入用プライマーを用いた P C R による方法等が挙げられる。

前記で改変されるアミノ酸の数については、少なくとも 1 残基、具体的には 1 若しくは数

10

20

30

40

50

個、又はそれ以上である。かかる改変の数は、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を見出すことのできる範囲であればよい。また前記欠失、置換若しくは付加のうち、特にアミノ酸の置換に係る改変が好ましい。当該置換は、疎水性、電荷、pK、立体構造上における特徴等の類似した性質を有するアミノ酸への置換がより好ましい。このような置換としては、例えば、1 グリシン、アラニン； 2 バリン、イソロイシン、ロイシン； 3 アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン； 4 セリン、スレオニン； 5 リジン、アルギニン； 6 フェニルアラニン、チロシンのグループ内での置換が挙げられる。

#### 【0015】

本発明において「(アミノ酸が)欠失、置換若しくは付加(された)」には、例えば、2つの蛋白質間のアミノ酸配列に関する高い配列同一性(具体的には、80%以上の配列同一性、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性)が存在している必要がある。また「ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする」には2つのDNA間の塩基配列に関する配列同一性(具体的には、80%以上の配列同一性、好ましくは90%以上、より好ましくは95%以上の配列同一性)が存在している必要がある。

ここで「配列同一性」とは、2つのDNA又は2つの蛋白質間の配列の同一性及び相同性をいう。前記「配列同一性」は、比較対象の配列の領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象のDNA又は蛋白質は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加又は欠失(例えばギャップ等)を有していてもよい。このような配列同一性に関しては、例えば、Vector NTIを用いて、ClustalWアルゴリズム(Nucleic Acid Res., 22(22):4673-4680(1994))を利用してアラインメントを作成することにより算出することができる。尚、配列同一性は、配列解析ソフト、具体的にはVector NTI、GENETYX-MACや公共のデータベースで提供される解析ツールを用いて測定される。前記公共データベースは、例えば、ホームページアドレスhttp://www.ddbj.nig.ac.jpにおいて、一般的に利用可能である。前記(d)、(d1)又は(d2)にある「ストリンジেন্টな条件下でハイブリダイズする」に関して、ここで使用されるハイブリダイゼーションは、例えば、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著、モレキュラークローニング第2版(Molecular Cloning 2nd edition)、コールドスプリングハーバーラボラトリー発行(Cold Spring Harbor Laboratory press)に記載される方法や、「クローニングとシーケンシング」(渡辺格監修、杉浦昌弘編集、1989年、農村文化社発行)に記載されているサザンハイブリダイゼーション法等の通常の方法に準じて行うことができる。また「ストリンジেন্টな条件下」とは、例えば、6xSSC(900mM NaCl、90mM クエン酸三ナトリウムを含む溶液。尚ここでは、NaCl175.3g、クエン酸三ナトリウム88.2gを含む溶液を水800mlで溶解し、10N NaClでpHを調製した後、全量を1000mlとした溶液を20xSSCとする。)中で65にてハイブリッドを形成させた後、2xSSCで50にて洗浄するような条件(Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6)等を挙げることができる。洗浄ステップにおける塩濃度は、例えば、2xSSCで50の条件(低ストリンジエンシーな条件)から0.1xSSCで65までの条件(高ストリンジエンシーな条件)から選択することができる。洗浄ステップにおける温度は、例えば、室温(低ストリンジエンシーな条件)から65(高ストリンジエンシーな条件)から選択することができる。また、塩濃度と温度の両方を変えることもできる。

#### 【0016】

本還元酵素遺伝子は、例えば、下記のような調製方法に準じて調製すればよい。

コリネバクテリウム・シュードジフテリティカム(Corynebacterium p 50

*seuodiphtheriticum*)等のコリネバクテリウム属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法に準じて染色体DNAを調製し、調製された染色体DNAを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号1で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号2で示される塩基配列を有するDNA等を増幅して本還元酵素遺伝子を調製する。

ここでコリネバクテリウム・シュードジフテリティカム由来の染色体DNAを鋳型として、かつ配列番号5に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号6に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行う場合には、配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを増幅して本還元酵素遺伝子を調製することになる。

当該PCRの条件としては、例えば、4種類のdNTPを各々20 $\mu$ M、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々15 pmol、Taq polymeraseを1.3 U及び鋳型となるcDNAライブラリーを混合した反応液を97 (2分間)に加熱した後、97 (0.25分間) - 50 (0.5分間) - 72 (1.5分間)のサイクルを10回、次いで97 (0.25分間) - 55 (0.5分間) - 72 (2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72 で7分間保持する条件が挙げられる。

尚、当該PCRに用いるプライマーの5'末端側には、制限酵素認識配列等を付加していてもよい。

上記のようにして増幅されたDNAを、Sambrook J., Frisch E. F., Maniatis T.著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition」(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987)、John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして組換えベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119(宝酒造社製)、pTV118N(宝酒造社製)、pBluescript II(東洋紡社製)、pCR2.1-TOPO(Invitrogen社製)、pTrc99A(Pharmacia社製)、pKK223-3(Pharmacia社製)等が挙げられる。このようにしてベクターに組み込んだ形態で本還元酵素遺伝子を調製すれば、後の遺伝子工学的手法における使用において便利である。

#### 【0017】

また、ペニシリウム・シトリナム(*Penicillium citrinum*)等のペニシリウム属に属する微生物等から通常の遺伝子工学的手法(例えば、「新細胞工学実験プロトコル」(東京大学医科学研究所制癌研究部編、秀潤社、1993年)に記載された方法)に準じてcDNAライブラリーを調製し、調製されたcDNAライブラリーを鋳型として、かつ適切なプライマーを用いてPCRを行うことにより、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号3で示されるアミノ酸配列において1若しくは複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列をコードする塩基配列からなるDNA、配列番号4で示される塩基配列を有するDNA等を増幅して本還元酵素遺伝子を調製する。

ここでペニシリウム・シトリナム由来のcDNAライブラリーを鋳型として、かつ配列番号7に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号8に示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いてPCRを行う場合には、配列番号4で示される塩基配列からなるDNAを増幅して本還元酵素遺伝子を調製することになる。

当該PCRの条件としては、例えば、4種類のdNTPを各々20 $\mu$ M、2種類のオリゴヌクレオチドプライマーを各々15 pmol、Taq polymeraseを1.3 U及び鋳型となるcDNAライブラリーを混合した反応液を97 (2分間)に加熱した後、

97 (0.25分間) - 50 (0.5分間) - 72 (1.5分間)のサイクルを10回、次いで97 (0.25分間) - 55 (0.5分間) - 72 (2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72 で7分間保持する条件が挙げられる。

尚、当該PCRに用いるプライマーの5'末端側には、制限酵素認識配列等を付加していてもよい。

上記のようにして増幅されたDNAを、Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.著「Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition」(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、「Current Protocols in Molecular Biology」(1987)、John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載されている方法に準じてベクターにクローニングして組換えベクターを得ることができる。用いられるベクターとしては、具体的には、例えば、pUC119(宝酒造社製)、pTV118N(宝酒造社製)、pBluescriptII(東洋紡社製)、pCR2.1-TOPO(Invitrogen社製)、pTrc99A(Pharmacia社製)、pKK223-3(Pharmacia社製)等が挙げられる。このようにしてベクターに組み込んだ形態で本還元酵素遺伝子を調製すれば、後の遺伝子工学的な手法における使用において便利である。

10

#### 【0018】

本形質転換体を調製する方法としては、例えば、本還元酵素遺伝子及び宿主細胞で機能可能なプロモーターが機能可能な形で接続されてなるDNAのような、本還元酵素遺伝子が宿主細胞中で発現できるような組換えプラスミド(例えば、プロモーター、ターミネーター等の発現制御に関わる領域を本還元酵素遺伝子に連結して組換えプラスミドを構築したり、ラクトースオペロンのような複数のシストロンを含むオペロンとして発現させるような組換えプラスミド)を作製し、これを宿主細胞に導入することにより作製する方法等があげられる。さらに、本還元酵素遺伝子を宿主細胞の染色体中に導入する方法も利用することができる。

20

上記の組換えプラスミドとしては、例えば、宿主細胞中で複製可能な遺伝情報を含み、自立的に増殖できるものであって、宿主細胞からの単離・精製が容易であり、宿主細胞中で機能可能なプロモーターを有し、検出可能なマーカーを持つ発現ベクターに、本還元酵素をコードする遺伝子が機能可能な形で導入されたものを好ましく挙げることもできる。尚、発現ベクターとしては、各種のものが市販されている。

30

ここで、「機能可能な形で」とは、上記の組換えプラスミドを宿主細胞に導入することにより宿主細胞を形質転換させた際に、本還元酵素遺伝子が、プロモーターの制御下に発現するようにプロモーターと結合された状態にあることを意味する。プロモーターとしては、大腸菌のラクトースオペロンのプロモーター、大腸菌のトリプトファンオペロンのプロモーター、又は、tacプロモーターもしくはtrcプロモーター等の大腸菌内で機能可能な合成プロモーター等をあげることができる。またコリネバクテリウム・シュードジフテリウム、ペニシリウム・シトリナム、バシラス・メガテリウムにおいて本還元酵素遺伝子の発現を制御しているプロモーターを利用してよい。

40

また発現ベクターとしては、選択マーカー遺伝子(例えば、カナマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性付与遺伝子等)を含むベクターを用いると、当該ベクターが導入された形質転換体を当該選択マーカー遺伝子の表現型等を指標にして容易に選択することができる。

さらなる高発現を導くことが必要な場合には、本還元酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子上流にリボゾーム結合領域を連結してもよい。用いられるリボゾーム結合領域としては、Guarente L.ら(Cell 20, p543)や谷口ら(Genetics of Industrial Microorganisms, p202, 講談社)による報告に記載されたものを挙げることもできる。

宿主細胞としては、原核生物(例えば、Escherichia属、Bacillus属

50

、*Corynebacterium*属、*Staphylococcus*属、*Streptomyces*属)もしくは真核生物(例えば、*Saccharomyces*属、*Kluyveromyces*属、*Aspergillus*属)である微生物細胞、昆虫細胞又は哺乳動物細胞等を挙げることができる。例えば、本形質転換体の大量調製が容易になるという観点では、大腸菌等を好ましく挙げることができる。

本還元酵素が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドを宿主細胞に導入する方法としては、用いられる宿主細胞に応じて通常使われる導入方法であればよく、例えば、「*Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition*」(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press、「*Current Protocols in Molecular Biology*」(1987)、John Wiley & Sons, Inc. ISBN0-471-50338-X等に記載される塩化カルシウム法や、「*Methods in Electroporation: Gene Pulser / E. coli Pulser System*」Bio-Rad Laboratories, (1993)等に記載されるエレクトロポレーション法等をあげることができる。宿主細胞において本還元酵素遺伝子が宿主細胞中で発現できるようなプラスミドが導入された形質転換体を選抜するには、前記の如く、例えば、ベクターに含まれる選択マーカー遺伝子の表現型を指標にして選抜すればよい。

プラスミドが導入された宿主細胞(即ち、形質転換体)が本還元酵素遺伝子を保有していることは、例えば、「*Molecular Cloning: A Laboratory Manual 2<sup>nd</sup> edition*」(1989)、Cold Spring Harbor Laboratory Press等に記載される通常の方法に準じて、制限酵素部位の確認、塩基配列の解析、サザンハイブリダイゼーション、ウエスタンハイブリダイゼーション等を行うことにより、確認することができる。

#### 【0019】

本形質転換体の培養は、微生物培養、昆虫細胞もしくは哺乳動物細胞の培養に使用される通常の方法によって行うことができる。例えば大腸菌の場合、適当な炭素源、窒素源およびビタミン等の微量栄養物を適宜含む培地中で培養を行う。培養方法としては、固体培養、試験管振盪式培養、往復式振盪培養、ジャーファーマンター(Jar Fermenter)培養、タンク培養等の液体培養のいずれの方法でもよく、好ましくは、通気攪拌培養法等の液体培養を挙げることができる。

培養温度は、本形質転換体が生育可能な範囲で適宜変更できるが、通常約10~50、好ましくは約20~40である。

培地はpH約6~8の範囲が好ましい。

培養時間は、培養条件によって異なるが通常約1日~約5日が好ましい。

本形質転換体を培養するための培地としては、例えば、微生物等の宿主細胞の培養に通常使用される炭素源や窒素源、有機塩や無機塩等を適宜含む各種の培地を用いることができる。

炭素源としては、例えば、グルコース、デキストリン、シュークロース等の糖類、グリセロール等の糖アルコール、フマル酸、クエン酸、ピルビン酸等の有機酸、動物油、植物油及び糖蜜が挙げられる。これらの炭素源の培地への添加量は培養液に対して通常0.1~30%(w/v)程度である。

窒素源としては、例えば、肉エキス、ペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、大豆粉、コーン・スティーブ・リカー(Corn Steep Liquor)、綿実粉、乾燥酵母、カザミノ酸等の天然有機窒素源、アミノ酸類、硝酸ナトリウム等の無機酸のアンモニウム塩、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウム等の有機酸のアンモニウム塩及び尿素が挙げられる。これらのうち有機酸のアンモニウム塩、天然有機窒素源、アミノ酸類等は多くの場合には炭素源としても使用することができる。これらの窒素源の培地への添加量は培養液に対して通常0.1~30%(w/v)程度である。

有機塩や無機塩としては、例えば、カリウム、ナトリウム、マグネシウム、鉄、マンガン、コバルト、亜鉛等の塩化物、硫酸塩、酢酸塩、炭酸塩及びリン酸塩を挙げることができる。具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、塩化コバルト、硫酸亜鉛、硫酸銅、酢酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素一カリウム及びリン酸水素二カリウムが挙げられる。これらの有機塩及び/又は無機塩の培地への添加量は培養液に対して通常0.0001~5%(w/v)程度である。

さらに、tacプロモーター、trcプロモーター及びlacプロモーター等のアロラクトースで誘導されるタイプのプロモーターと、本還元酵素のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有する遺伝子とが機能可能な形で接続されてなるDNAが導入されてなる形質転換体の場合には、本還元酵素の生産を誘導するための誘導剤として、例えば、isopropyl thio-D-galactoside (IPTG)を培地中に少量加えることもできる。

10

#### 【0020】

本形質転換体の取得は、例えば、前記の培養により得られた培養物を遠心分離等により形質転換体を沈殿物として回収すればよい。必要に応じて、回収前に当該形質転換体を、例えば、100mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー(pH6.5)等の緩衝液等を用いて洗浄してもよい。

#### 【0021】

本発明製造方法では、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成させるための触媒として、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物が使用される。

20

一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素を産生する微生物の、本発明製造方法の反応に用いる形態には、例えば、(1)培養液をそのまま用いる形態、(2)培養液の遠心分離等により菌体を集め、当該菌体を緩衝液若しくは水で洗浄することにより得られた湿菌体を用いる形態、等の培養により得られた微生物の菌体をその用いる形態が含まれる。

一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素あるいは当該酵素又は当該酵素を産生する微生物の処理物の、本発明製造方法の反応に用いる形態には、例えば、培養液の遠心分離等により菌体を集め、当該菌体を緩衝液若しくは水で洗浄した湿菌体を、(1)有機溶媒(アセトン、エタノール等)処理することにより得られたものを用いる形態や(2)凍結乾燥処理することにより得られたものを用いる形態や(3)アルカリ処理することにより得られたものを用いる形態や(4)菌体を物理的に又は酵素的に破砕することにより得られたものを用いる形態、さらには、これらのものを公知の方法により固定化処理することにより得られたものを用いる形態も含まれる。

30

#### 【0022】

一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を有する酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物のうち、一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元する能力を人為的に付与されてなる形質転換体又はその死菌化細胞が好ましく使用される。

40

#### 【0023】

本形質転換体から、その死菌化細胞を下記の方法により調製することもできる。死菌化処理方法としては、例えば、物理的殺菌法(加熱、乾燥、冷凍、光線、超音波、濾過、通電)や、化学薬品を用いる殺菌法(アルカリ、酸、ハロゲン、酸化剤、硫黄、ホウ素、砒素、金属、アルコール、フェノール、アミン、サルファイド、エーテル、アルデヒド、ケトン、シアン及び抗生物質)をあげることができる。尚、これらの殺菌法のうちで

50

きるだけ本還元酵素の酵素活性を失活させず、かつ反応系への残留、汚染などの影響が少ない処理方法を各種の反応条件に応じて適宜選択することがよい。

【0024】

このようにして調製された形質転換体又はその死菌化細胞は、例えば、凍結乾燥細胞、有機溶媒処理細胞、乾燥細胞等の形態、あるいは、固定化された形態（固定化物）で利用してもよい。

【0025】

固定化物を得る方法としては、例えば、担体結合法（シリカゲルやセラミック等の無機担体、セルロース、イオン交換樹脂等に本形質転換体又はその死菌化細胞を吸着させる方法）及び包括法（ポリアクリルアミド、含硫多糖ゲル（例えばカラギーナンゲル）、アルギン酸ゲル、寒天ゲル等の高分子の網目構造の中に本形質転換体又はその死菌化細胞を閉じ込める方法）が挙げられる。

10

【0026】

続いて、本発明製造方法における触媒反応について説明する。

本発明製造方法において一般式（1）で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを一般式（2）で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルに変換する反応は、4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルに本還元酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物を作用させることによって達成される。

当該反応は、通常、水の存在下で行われる。水は緩衝液の形態であってもよく、この場合に用いられる緩衝剤としては、例えば、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等のリン酸アルカリ金属塩、酢酸ナトリウム、酢酸カリウム等の酢酸のアルカリ金属塩が挙げられる。尚、緩衝液を溶媒として用いる場合、その量は一般式（1）で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステル1重量部に対して、通常、1～300重量倍、好ましくは5～100重量倍である。

20

当該反応に際しては、一般式（1）で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを反応系内に連続又は逐次加えてもよい。

【0027】

反応温度としては、本還元酵素又は当該酵素を産生する微生物、あるいはそれらの処理物に含まれた本還元酵素の安定性、反応速度の点から0～70程度をあげることができ、好ましくは約10～40があげられる。

30

反応pHとしては、反応が進行する範囲内で適宜変化させることができるが、例えば、pH5～8をあげることができる。

【0028】

反応は、水の他に有機溶媒の共存下に行うこともできる。この場合の有機溶媒としては、例えば、テトラヒドロフラン、t-ブチルメチルエーテル、イソプロピルエーテル等のエーテル類、トルエン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、イソオクタン、デカン等の炭化水素類、t-ブタノール、メタノール、エタノール、イソプロパノール、n-ブタノール等のアルコール類、ジメチルスルホキサイドなどのスルホキサイド類、アセトン等のケトン類、アセトニトリル等のニトリル類及びこれらの混合物が挙げられる。

反応に使用する有機溶媒の量は、一般式（1）で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルに対して、通常、100重量倍以下であり、好ましくは70重量倍以下である。

40

【0029】

反応は、例えば、NADH、NADPHのような補酵素を加えて通常行うことがよい。

反応に用いられる補酵素の量は、一般式（1）で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルに対して、通常、0.5重量倍以下、好ましくは0.1重量倍以下である。

反応はさらに、必要に応じて、グルコース、シュークロース、フルクトース等の糖類、エタノール等のアルコール類、界面活性剤等を加えて行うこともできる。

【0030】

50

反応の終点は、例えば、反応液中の原料化合物の存在量を液体クロマトグラフィー、ガスクロマトグラフィー等により追跡することにより決定することができる。反応時間の範囲としては、通常、5分間～10日間、好ましくは30分間～4日間の範囲をあげることができる。

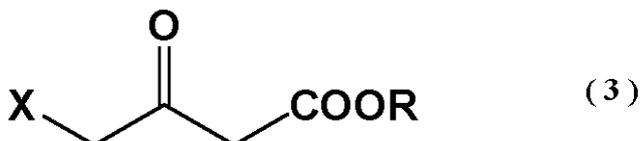
【0031】

反応終了後は、触媒として酵素や微生物等を使用して化合物を製造する方法において通常用いられる化合物の回収方法により目的物を採取すればよい。例えば、まず反応液をヘキサン、ヘプタン、tert-ブチルメチルエーテル、酢酸エチル、トルエン等の有機溶媒で抽出する。必要に応じて反応液を濾過したり、又は遠心分離等の処理により不溶物を除去した後に前記抽出操作を行えばよい。次に抽出された有機層を乾燥した後、濃縮物として目的物を回収することができる。目的物は、必要によりカラムクロマトグラフィー等によりさらに精製することができる。

10

【0032】

本発明製造方法では、その前工程として、4-ハロ-3-オキソブタン酸エステルの4位にあるハロゲン原子をアセトキシ基に置換することにより一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを得る工程を付加的に有してもよい。具体的には、本発明製造方法は、種々の医農薬の中間体に誘導されており、工業的に利用可能な化合物である、一般式(3)



20

(式中、RはC1-C8アルキル基、Xは塩素、臭素又はヨウ素を表す。)

で示される4-ハロ-3-オキソブタン酸エステルの4位ハロゲン原子をアセトキシ基に置換することにより一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを得る工程を前工程として付加的に有し、得られた一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルから一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを得る製造方法であってもよい。

【0033】

ここで出発化合物として用いられる一般式(3)で示される4-ハロ-3-オキソブタン酸エステルにおいて、Rで示されるC1-C8アルキル基としては、例えば、メチル基、エチル基、プロピル基、オクチル基等をあげることができる。一般式(3)で示される4-ハロ-3-オキソブタン酸エステルの具体的な例としては、4-ブromo-3-オキソブタン酸エステル等をあげることができる。因みに、当該化合物は、アセト酢酸エステルのブrom化により容易に製造可能である。

30

【0034】

一般式(3)で示される4-ハロ-3-オキソブタン酸エステルの4位ハロゲン原子をアセトキシ基に置換することにより一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルを得る工程において用いられるアセトキシ化の反応試剤としては、例えば、酢酸カリウム、酢酸ナトリウム、酢酸リチウム、酢酸アンモニウム等の酢酸塩をあげられる。当該工程は、通常有機溶媒の存在下で行うが、必要に応じて無溶媒で実施することもできる。かかる溶媒として、例えば、メタノール、エタノール等のアルコール類、トルエン等の芳香族炭化水素類、酢酸エチル等のエステル類、アセトニトリル等のニトリル類、メチル tert-ブチル エーテル、テトラヒドロフラン等のエーテル類、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等の極性溶媒、シクロヘキサン、ヘプタン等の炭化水素溶媒、等を、単独で用いてもよいし、2種類以上を混合して用いてもよい。当該工程の反応温度は、反応を進行させるのに十分な温度であれば制限はないが、通常、0～100程度、好ましくは10～80程度、より好ましくは20～70である。

40

【0035】

50

このようにして生成された一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルは、必要に応じて、一旦採取・精製してから次の工程に供してもよいしそのまま次の工程に供してもよい。採取・精製には、例えば、反応混合物に対し洗浄分液、濃縮等の処理操作を行う方法・クロマトグラフィー、蒸留、再結晶等の精製操作等の通常の方法を用いればよい。

【0036】

【実施例】

以下、製造例等により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0037】

実施例1 (本還元酵素遺伝子の調製(その1)及び本還元酵素遺伝子を含有する形質転換体の調製)

配列番号2で示される塩基配列からなるDNAを含有するプラスミドpKARを以下のようにして調製した。

まず、Appl Microbial Biotechnol(1999)52:386-392等に記載される公知のプラスミドpUAR(受託番号FERM P-18127)から、配列番号2で示されるDNAを含むDNA断片を、PstI及びSmaIを用いて切り出した。切り出されたDNA断片を、PstI/SmaI処理したpKK223-3ベクター(Amersham Pharmacia Biotech社製)のTacプロモーターの下流に挿入した。このようにしてプラスミドpKARを構築した。

構築されたプラスミドpKARを用いてE. coli JM109株を形質転換した。次に、フラスコに液体培地(水1000mlにトリプトン10g、酵母エキス5g及び塩化ナトリウム5gを溶解した。この溶液に1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpHを7.0に調整した。)100mlを入れ、滅菌した後、アンピシリンを100μg/ml、ZnCl<sub>2</sub>を0.01%(w/v)、isopropyl thio-D-galactoside(IPTG)を0.4mMになるように加えた。このようにして調製された培地に、上記で得られた形質転換体(E. coli JM109/pKAR株)が前記組成の液体培地で予め培養された培養液0.3mlを接種し、これを30で14時間振盪培養した。

培養後、得られた培養液を遠心分離(15000×g、15分、4)することにより、菌体を回収した。回収された菌体を、50mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー(pH7.0)30mlに懸濁し、この懸濁液を遠心分離(15000×g、15分、4)することにより、本還元酵素遺伝子を含有する形質転換体である洗浄菌体を得た。

【0038】

実施例2 (本還元酵素遺伝子の調製(その2))

(2-1)染色体DNAの調製

フラスコに液体培地(水1000mlにトリプトン5g、酵母エキス2.5g、塩化ナトリウム4g、ゼラチン2.5g、酢酸ナトリウム1.5g及びスレオニン2.4gを溶解する。この溶液に1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下することによりpHを7.0に調整する。)100mlを入れ、滅菌する。このようにして調製された培地に、特開平10-94399等に記載される公知のコリネバクテリウム・シュードジフテリティカム亜種(Corynebacterium pseudodiphtheriticum)ST-10株(受託番号FERM P-13150)が前記組成の液体培地で予め培養された培養液0.3mlを接種し、これを30で10時間振盪培養する。

培養後、得られた培養液を遠心分離(15000×g、15分、4)することにより、菌体を回収する。回収された菌体を、50mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファー(pH7.0)30mlに懸濁し、この懸濁液を遠心分離(15000×g、15分、4)することにより、洗浄菌体を得る。

このようにして得られる洗浄菌体を用いて、J. C. Wangらの方法(Appl Mi

10

20

30

40

50

crobiol Biotechnol (1999) 52:386-392) によって染色体DNAを調製する。

【0039】

(2-2) 本還元酵素遺伝子を含有するプラスミドの調製(プラスミドpTrcPARの構築)

配列番号5で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号6で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドとをプライマーに、前記(2-1)で調製される染色体DNAを鋳型にして下記反応液組成、反応条件でPCRを行う。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

10

【0040】

[反応液組成]

染色体DNA	1 $\mu$ l	
dNTP (各2.5mM-mix)		0.4 $\mu$ l
プライマー(20pmol/ $\mu$ l)		各0.75 $\mu$ l
10xbuffer (with MgCl <sub>2</sub> )		5 $\mu$ l
enz.expandHiFi (3.5x10 <sup>3</sup> U/ml)		0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l	

【0041】

[反応条件]

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400にセットし、97 (2分間)に加熱した後、97 (0.25分間) - 55 (0.5分間) - 72 (1.5分間)のサイクルを10回、次いで97 (0.25分間) - 55 (0.5分間) - 72 (2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72 で7分間保持する。

20

【0042】

PCR反応液を精製して得られたPCR増幅DNA断片に2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該DNA断片を2重消化する。次いで得られるDNA断片を精製する。

一方、ベクターpTrc99A(Pharmacia製)を2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該ベクターを2重消化する。次いで得られるDNA断片を精製する。

30

このようにして精製して得られる2種類のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションする。得られるライゲーション液でE.coli DH5 を形質転換する。

得られる形質転換体からQIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen社製)を用いて本還元酵素遺伝子を含有するプラスミド(以下、プラスミドpTrcPARと記すこともある。)を取り出す。

【0043】

実施例3 (本還元酵素遺伝子の調製(その3))

40

(3-1) cDNAライブラリーの調製

500mlフラスコに培地(水にポテト・デキストロース・ブロー(ベクトン・ディッキンソン社製)を24g/Lの割合で溶解したもの)100mlを入れ、121 で15分間滅菌した。ここに同組成の培地中で培養(30、48時間、振盪培養)したペニシリウム・シトリナム(Penicillium citrinum)IFO4631株の培養液0.5mlを加え、30 で72時間振盪培養した。その後、得られた培養液を遠心し(8000xg、10分)、生じた沈殿を集めた。この沈殿を20mMリン酸カリウムバッファー(pH7.0)50mlで3回洗浄して、約1.0gの洗浄菌体を得た。

ペニシリウム・シトリナム(Penicillium citrinum)IFO4631株の洗浄菌体を用いて、チオシアン酸グアニジンフェノールクロロホルム法で全RNA

50

を調製した。調製された全RNAから、Oligotex (dT) 30-Super (宝酒造社製)を用いてpoly(A)を有するRNAを得た。

cDNAライブラリーの作製は、Gubler and Hoffman法に基づいて実施した。まず、上記のようにして得られたpoly(A)を有するRNA、Oligo(dT)18-リンカープライマー((含XhoIサイト)宝酒造社製)、RAV-2 Rtasase及びSuperScript II Rtasaseを用いて一本鎖cDNAを調製した。調製された一本鎖cDNA(を含む前記反応液)にE. coli DNA polymerase、E. coli Rnase/E. coli DNA Ligase Mixture及びT4 DNA Polymeraseを加えることにより、二本鎖cDNAの合成及び当該二本鎖cDNAの平滑末端化処理を行った。

10

このようにして得られた二本鎖cDNAとEcoRI-NotI-BamHIアダプター(宝酒造社製)とのライゲーションを行った。ライゲーション後に得られたDNAを、以下の順で、リン酸化処理、XhoIでの切断処理、スピンカラム(宝酒造社製)を用いる低分子量DNAの除去処理、ZapII(EcoRI-XhoI切断)とのライゲーションした後、in vitro packaging kit (STRATAGENE社製)を用いてパッケージングすることにより、cDNAライブラリー(以下、cDNAライブラリー(A)と記すこともある。)を調製した。

#### 【0044】

(3-2)本還元酵素遺伝子を含有するプラスミドの調製(プラスミドpTrcRPlcの構築)

20

配列番号7で示される塩基配列を有するオリゴヌクレオチドと配列番号8で示されるオリゴヌクレオチドとをプライマーに用いて、前記(3-1)で調製されたcDNAライブラリーを鋳型にして下記反応液組成、反応条件でPCRを行った。(ロシュ・ダイアグノスティック社製のExpand High Fidelity PCR Systemを使用)

#### 【0045】

##### [反応液組成]

cDNAライブラリー原液	1 $\mu$ l	
dNTP(各2.5mM-mix)		0.4 $\mu$ l
プライマー(20pmol/ $\mu$ l)		各0.75 $\mu$ l
10xbuffer(with MgCl <sub>2</sub> )		5 $\mu$ l
enz.expandHiFi(3.5x10 <sup>3</sup> U/ml)		0.375 $\mu$ l
超純水	41.725 $\mu$ l	

30

#### 【0046】

##### [反応条件]

上記組成の反応液が入った容器をPERKIN ELMER-GeneAmp PCR System 2400にセットし、97(2分間)に加熱した後、97(0.25分間)-55(0.5分間)-72(1.5分間)のサイクルを10回、次いで97(0.25分間)-55(0.5分間)-72(2.5分間)のサイクルを20回行い、さらに72で7分間保持した。

40

#### 【0047】

PCR反応液を精製して得られたPCR増幅DNA断片に2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該DNA断片を2重消化させた。次いで得られたDNA断片を精製した。

一方、ベクターpTrc99A(Pharmacia製)を2種類の制限酵素(NcoI及びBamHI)を加えることにより、当該ベクターを2重消化させた。次いで消化されたDNA断片を精製した。

このようにして精製して得られた2種類のDNA断片を混合し、T4 DNAリガーゼでライゲーションした。得られたライゲーション液でE. coli DH5を形質転換した。

50

得られた形質転換体から Q I A p r e p S p i n M i n i p r e p K i t ( Q i a g e n 社製 ) を用いて本還元酵素遺伝子を含むプラスミド ( 以下、プラスミド p T r c R P c と記すこともある。 ) を取り出した。

【 0 0 4 8 】

実施例 4 ( 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法 )

1 0 0 m M リン酸 1 カリウム - リン酸 2 カリウムバッファー ( p H 7 . 0 ) 1 . 5 m l に、実施例 1 で調製された洗浄菌体 1 5 m g 、 N A D <sup>+</sup> 1 . 3 m g 及び 5 % ( v / v ) の 2 - プロパノールを加えた。この混合物に、さらに 1 5 m g の 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸メチルを加えた。このようにして得られた混合物 ( 反応液 ) を 3 0 ° C で 2 1 時間攪拌することにより反応を行った。反応終了後、反応液に酢酸ブチル 1 . 5 m l を注加攪拌し、次いで遠心分離することにより有機層及び水層を別々に回収した。回収された水層に再度酢酸エチル 1 . 5 m l を加えて同様な操作を行った。このようにして得られた有機層を合一濃縮した後、これをクロロホルム 3 0 m l に溶解し、無水 N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> を用いて乾燥した。乾燥後、クロロホルムを留去することにより、4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸メチルを得た。収率 2 7 % ( G C 分析 ) であった。

10

G C 条件

カラム : D B - 1 ( 0 . 5 3 m m × 3 0 m 、 1 . 5 μ m )

注入口温度 : 1 7 0

検出器 ( F I D ) : 3 0 0

カラム室温度 : 5 0 ( 保持 : 5 分 ) 5 / 分 1 7 0 ( 保持 : 0 分 ) ( 昇温 : 3 0 / 分 ) 2 9 0 ( 保持 : 0 分 )

20

キャリアガス 1 0 m L / 分

4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸メチルの保持時間 1 0 分

【 0 0 4 9 】

実施例 5 ( 一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステルの 3 位にあるケトン還元して一般式 ( 2 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する微生物の取得 )

( 5 - 1 ) 洗浄菌体の調製

市販の微生物又は土壌などから単離した微生物を滅菌 L B 培地 ( 1 0 m l ) に接種した後、これを振盪培養する ( 3 0 ° C 、 1 8 時間 ) 。培養後、培養液を遠心分離・洗浄することにより、洗浄菌体を回収する。

30

( 5 - 2 ) スクリーニング

1 0 0 m M リン酸 1 カリウム - リン酸 2 カリウムバッファー ( p H 6 . 5 ) 2 0 m l に、上記 ( 5 - 1 ) で調製された洗浄菌体 1 g 、 N A D P <sup>+</sup> 1 2 m g 、 N A D <sup>+</sup> 1 2 m g 及びグルコース 2 . 5 g を加える。この混合物に、さらに一般式 ( 1 ) で示される 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸エステル 2 4 0 m g を加えた後、当該混合物の p H を 1 5 % 炭酸ナトリウム水溶液で 6 . 5 に調製する。このようにして得られる混合物 ( 反応液 ) を 3 0 ° C で 4 時間攪拌することにより反応を行う。反応終了後、反応液に酢酸エチル 2 5 m l を注加攪拌し、次いで遠心分離することにより有機層及び水層を別々に回収する。回収される水層に再度酢酸エチル 2 5 m l を加えて同様な操作を行う。このようにして得られる有機層を合一濃縮した後、これをクロロホルム 3 0 m l に溶解し、無水 N a <sub>2</sub> S O <sub>4</sub> を用いて乾燥する。乾燥後、クロロホルムを留去することにより残渣を得る。得られる残渣に、4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルが含まれていることを液体クロマトグラフィー又はガスクロマトグラフィーにて定性及び / 定量分析により確認する。

40

【 0 0 5 0 】

参考例 1 ( 4 - アセトキシ - 3 - オキソブタン酸メチルの調製 )

N N - ジメチルホルムアミド 2 5 g に溶解した 4 - プロモ - 3 - オキソブタン酸メチル 5 g に酢酸カリウム 2 . 8 g を加え、2 0 ° C で攪拌 2 時間攪拌した。氷冷下、反応液に酢酸エチル 1 0 0 m L 、ヘキサン 1 5 m L 、水 6 0 m L を加えて洗浄分液した。水層にさらに酢酸エチル 2 0 m L 、ヘキサン 1 5 m L を加え抽出分液をおこなった。油層を合一し濃縮

50

することにより目的の4-アセトキシ-3-オキソブタン酸メチルを得た(3.4 g、GC純度 84%)。目的物の同定はH-NMRにより行った。

GC条件

カラム: DB-1 (0.53 mm x 30 m, 1.5 μm)

注入口温度: 170

検出器(FID): 300

カラム室温度: 50 (保持5分) 5 /分 170 (保持0分) (30 /分) 290 (保持0分)

キャリアガス 10 mL /分

4-アセトキシ-3-オキソブタン酸メチルの保持時間 8.7分

H-NMR ( , ppm, CDCl<sub>3</sub>); 2.2 (3H, s), 3.5 (2H, s), 3.8 (3H, s), 4.8 (2H, s)

【0051】

実施例6 (一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸エステルの3位にあるケトン還元して一般式(2)で示される4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルを生成する能力を有する微生物の調製)

500 mlの坂口フラスコに滅菌済み培地(1 Lの水にポテト抽出物200 g及びデキストロース20 gを加えたもの)100 mlを入れ、ここに市販のバシラス・アルベイ(Bacillus alvei)IFO3343(財団法人発酵研究所(www.ifo.or.jp)から入手可能)の菌体を植菌した。これを30 で好気条件下、振盪培養した。その後、培養液を遠心分離して菌体を集め、集められた菌体を生理的食塩水5 mlに懸濁した。この菌体懸濁液に冷やしたアセトン300 mlを加え、濾過した。回収された菌体を真空乾燥することにより、バシラス・アルベイ(Bacillus alvei)IFO3343のアセトン乾燥処理菌体10 gを得た。

【0052】

実施例7 (4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法(その2))

100 mMリン酸1カリウム-リン酸2カリウムバッファ(pH 6.5)1.5 mlに、実施例6で調製されたアセトン乾燥処理菌体15 mg、グルコース75 mg、NADP<sup>+</sup> 9 mg及びグルコースデヒドロゲナーゼ15 Uを加えた。この混合物に、さらに一般式(1)で示される4-アセトキシ-3-オキソブタン酸メチル15 mgを加えた後、当該混合物のpHを15%炭酸ナトリウム水溶液で6.5に調製した。このようにして得られる混合物(反応液)を30 で24時間攪拌することにより反応を行った。反応終了後、反応液に酢酸エチル1.5 mlを注加攪拌し、次いで遠心分離することにより有機層及び水層を別々に回収した。回収される水層に再度酢酸エチル1.5 mlを加えて同様な操作を行った。このようにして得られる有機層を合一濃縮した後、これをクロロホルム30 mlに溶解し、無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を用いて乾燥した。乾燥後、クロロホルムを留去することにより残渣を得た。得られた残渣に、4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸メチルが含まれていることをガスクロマトグラフィーにて定量分析した。収率21%(GC分析)

GC条件

カラム: DB-1 (0.53 mm x 30 m, 1.5 μm)

注入口温度: 170

検出器(FID): 300

カラム室温度: 50 (保持5分) 5 /分 170 (保持0分) (30 /分) 290 (保持0分)

キャリアガス 10 mL /分

4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸メチルの保持時間 10分

【0053】

実施例8~18 (4-アセトキシ-3-ヒドロキシブタン酸エステルの製造方法(その3~13))

10

20

30

40

50

バシラス・アルベイ (*Bacillus alvei*) の代わりに、表 1 に記載される 11 種の微生物を用いること以外は実施例 6 に記載される方法に準じて各微生物のアセトン乾燥処理菌体を調製した。該アセトン乾燥処理菌体を用いて、実施例 7 に記載される方法に準じて 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸メチルの製造を行った。GC 分析により 4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸メチルの収率を求めた。結果を表 1 に示す。

【 0 0 5 4 】

【 表 1 】

微生物	収率
<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 21003	14%
<i>Arthrobacter paraffines</i> ATCC 21087	19%
<i>Rhodotorula minuta</i> IFO 412	15%
<i>Rhodotorula minuta</i> IFO 879	16%
<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 15591	17%
<i>Arthrobacter paraffineus</i> ATCC 19065	14%
<i>Bacillus sphaericus</i> IFO 3528	17%
<i>Pseudomonas picketti</i> JCM 5969t	15%
<i>Rhodotorula glutinis</i> IFO 389	18%
<i>Rhodococcus globerulus</i> ATCC 15076	18%
<i>Streptomyces rutgersensis</i> IFO 12819	13%

10

20

【 0 0 5 5 】

30

【 発明の 効果 】

本発明により、4 - アセトキシ - 3 - ヒドロキシブタン酸エステルを効率的又は簡便に製造することができる。

[ 配列表フリーテキスト ]

配列番号 5

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

配列番号 6

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

配列番号 7

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

配列番号 8

PCR のために設計されたプライマーであるオリゴヌクレオチド

40

【 0 0 5 6 】

【 配列表 】

<110> Sumitomo Chemical Co.,Ltd

<120> Method for producing 4-acetoxy-3-hydroxybutane carboxylic acid ester

<130> P154836

<160> 8

10

<210> 1

<211> 385

<212> PRT

<213> *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

<400> 1

20

Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr 16  
 1 5 10 15

Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val 32  
 20 25 30

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro 48  
 35 40 45

30

Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly 64  
 50 55 60

Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile 80  
 65 70 75 80

40

Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp	96	
85	90	95
His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu	112	
100	105	110
Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe	128	10
115	120	125
Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp	144	
130	135	140
Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His	160	
145	150	155
Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val	176	
165	170	175
Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg	192	
180	185	190
His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys	208	30
195	200	205
Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp	224	
210	215	220
Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala	240	40
225	230	235
		240

Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala	256	
245	250	255
Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly	272	
260	265	270
Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu	288	10
275	280	285
Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu	304	
290	295	300
Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Gly Gly Gly Asp	320	20
305	310	315
320		325
Leu Gln Ser Arg Gln Arg Cys Arg Ser Val Ser Thr Thr Gly Cys Arg	336	
325	330	335
Asn Ala Gln Arg Pro Cys Gly Cys Gly Pro Trp Ser Val Val Pro Thr	352	30
340	345	350
Ala Val Glu Arg Gln Arg Lys Asn Thr Asp Ala Arg Pro Asn Ser Ile	368	
355	360	365
Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Asn Ser Val Cys Ala Ser Cys Thr Pro	384	
370	375	380
Arg		385
		40

385

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 1158

&lt;212&gt; DNA

<213> *Corynebacterium pseudodiphtheriticum*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1158)

&lt;400&gt; 2

atg aag gcg atc cag tac acg cga atc ggc gcg gaa ccc gaa ctc acg 48

Met Lys Ala Ile Gln Tyr Thr Arg Ile Gly Ala Glu Pro Glu Leu Thr

1

5

10

15

gag att ccc aaa ccc gag ccc ggt cca ggt gaa gtg ctc ctg gaa gtc 96

Glu Ile Pro Lys Pro Glu Pro Gly Pro Gly Glu Val Leu Leu Glu Val

20

25

30

acc gct gct ggc gtc tgc cac tcg gac gac ttc atc atg agc ctg ccc 144

Thr Ala Ala Gly Val Cys His Ser Asp Asp Phe Ile Met Ser Leu Pro

35

40

45

gaa gag cag tac acc tac ggc ctt ccg ctc acg ctc ggc cac gaa ggc 192

Glu Glu Gln Tyr Thr Tyr Gly Leu Pro Leu Thr Leu Gly His Glu Gly

50

55

60

gca ggc aag gtc gcc gcc gtc ggc gag ggt gtc gaa ggt ctc gac atc 240

10

20

30

40

Ala Gly Lys Val Ala Ala Val Gly Glu Gly Val Glu Gly Leu Asp Ile  
 65 70 75 80

gga acc aat gtc gtc gtc tac ggg cct tgg ggt tgc ggc aac tgt tgg 288  
 Gly Thr Asn Val Val Val Tyr Gly Pro Trp Gly Cys Gly Asn Cys Trp  
 85 90 95

cac tgc tca caa gga ctc gag aac tat tgc tct cgc gcc caa gaa ctc 336  
 His Cys Ser Gln Gly Leu Glu Asn Tyr Cys Ser Arg Ala Gln Glu Leu  
 100 105 110

gga atc aat cct ccc ggt ctc ggt gca ccc ggc gcg ttg gcc gag ttc 384  
 Gly Ile Asn Pro Pro Gly Leu Gly Ala Pro Gly Ala Leu Ala Glu Phe  
 115 120 125

atg atc gtc gat tct cct cgc cac ctt gtc ccg atc ggt gac ctc gac 432  
 Met Ile Val Asp Ser Pro Arg His Leu Val Pro Ile Gly Asp Leu Asp  
 130 135 140

ccg gtc aag acg gtg ccg ctg acc gac gcc ggt ctg acg ccg tat cac 480  
 Pro Val Lys Thr Val Pro Leu Thr Asp Ala Gly Leu Thr Pro Tyr His  
 145 150 155 160

gcg atc aag cgt tct ctg ccg aaa ctt cgc gga ggc tcg tac gcg gtt 528  
 Ala Ile Lys Arg Ser Leu Pro Lys Leu Arg Gly Gly Ser Tyr Ala Val  
 165 170 175

gtc att ggt acc ggc ggt ctc ggc cac gtc gct att cag ctc ctc cgc 576  
 Val Ile Gly Thr Gly Gly Leu Gly His Val Ala Ile Gln Leu Leu Arg

10

20

30

40

180	185	190	
cac ctc tcg gcg gca acg gtc atc gct ttg gac gtg agc gcg gac aag			624
His Leu Ser Ala Ala Thr Val Ile Ala Leu Asp Val Ser Ala Asp Lys			
195	200	205	
ctc gaa ctg gca acc aag gta ggc gct cac gaa gtg gtt ctg tcc gac			672
Leu Glu Leu Ala Thr Lys Val Gly Ala His Glu Val Val Leu Ser Asp			10
210	215	220	
aag gac gcg gcc gag aac gtc cgc aag atc act gga agt caa ggc gcc			720
Lys Asp Ala Ala Glu Asn Val Arg Lys Ile Thr Gly Ser Gln Gly Ala			
225	230	235	240
			20
gca ttg gtt ctc gac ttc gtc ggc tac cag ccc acc atc gac acc gcg			768
Ala Leu Val Leu Asp Phe Val Gly Tyr Gln Pro Thr Ile Asp Thr Ala			
245	250	255	
atg gct gtc gcc ggc gtc gga tca gac gtc acg atc gtc ggg atc ggg			816
Met Ala Val Ala Gly Val Gly Ser Asp Val Thr Ile Val Gly Ile Gly			
260	265	270	30
gac ggc cag gcc cac gcc aaa gtc ggg ttc ttc caa agt cct tac gag			864
Asp Gly Gln Ala His Ala Lys Val Gly Phe Phe Gln Ser Pro Tyr Glu			
275	280	285	
gct tcg gtg aca gtt ccg tat tgg ggt gcc cgc aac gag ttg atc gaa			912
Ala Ser Val Thr Val Pro Tyr Trp Gly Ala Arg Asn Glu Leu Ile Glu			40
290	295	300	

ttg atc gac ctc gcc cac gcc ggc atc ttc gac atc ggc ggt gga gac	960	
Leu Ile Asp Leu Ala His Ala Gly Ile Phe Asp Ile Gly Gly Gly Asp		
305	310	315
320		
ctt cag tct cga caa cgg tgc cga agc gta tgc acg act ggc tgc cgg	1008	
Leu Gln Ser Arg Gln Arg Cys Arg Ser Val Ser Thr Thr Gly Cys Arg		10
	325	330
		335
aac gct cag cgg ccg tgc ggt tgt ggt ccc tgg tct gta gta ccg aca	1056	
Asn Ala Gln Arg Pro Cys Gly Cys Gly Pro Trp Ser Val Val Pro Thr		
	340	345
		350
gcg gta gaa cga cag cgg aaa aac act gat gcc cgg ccg aat tgc att	1104	
Ala Val Glu Arg Gln Arg Lys Asn Thr Asp Ala Arg Pro Asn Ser Ile		20
	355	360
		365
cgg ccg ggc atc agt gtc aga aat tgc gtg tgc gct agc tgc acg cct	1152	
Arg Pro Gly Ile Ser Val Arg Asn Ser Val Cys Ala Ser Cys Thr Pro		
	370	375
		380
cga tga	1158	
Arg		
385		
<210> 3		
<211> 325		
<212> PRT		40
<213> <i>Penicillium citrinum</i>		

(400) 3

Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro	16	
1 5 10 15		
Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr	32	
20 25 30		10
Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp	48	
35 40 45		
Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg	64	
50 55 60		20
Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val	80	
65 70 75 80		
Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp	96	
85 90 95		
Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met	112	
100 105 110		30
Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu	128	
115 120 125		
Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr	144	
130 135 140		40

Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp	160	
145	150	155 160
Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu	176	
	165	170 175
Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile	192	10
	180	185 190
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe	208	
	195	200 205
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn	224	
	210	215 220
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn	240	
225	230	235 240
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala	256	
	245	250 255
		30
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro	272	
	260	265 270
Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp	288	
	275	280 285
Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val	304	40
	290	295 300

Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala	320
305	310 315 320

Lys Asn Leu Ser Ala	325
325	

10

<210> 4

<211> 978

<212> DNA

<213> *Penicillium citrinum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(978)

20

<400> 4

atg tct aac gga aag act ttc aca ttg agc aac ggc gtc aag att cct	48
Met Ser Asn Gly Lys Thr Phe Thr Leu Ser Asn Gly Val Lys Ile Pro	
1 5 10 15	

30

ggc gtc ggc ttt ggt acc ttc gct agt gaa ggt tcc aag ggc gag acc	96
Gly Val Gly Phe Gly Thr Phe Ala Ser Glu Gly Ser Lys Gly Glu Thr	
20 25 30	

tat act gct gtc acc act gcc ctg aag acc ggt tac cgt cac ttg gac	144
Tyr Thr Ala Val Thr Thr Ala Leu Lys Thr Gly Tyr Arg His Leu Asp	
35 40 45	

40

tgt gcc tgg tac tac ctg aac gag ggt gag gtt ggt gag ggt atc cgt	192	
Cys Ala Trp Tyr Tyr Leu Asn Glu Gly Glu Val Gly Glu Gly Ile Arg		
50 55 60		
gac ttc ctg aag gag aac ccc tcg gtg aag cgt gag gac atc ttc gtc	240	
Asp Phe Leu Lys Glu Asn Pro Ser Val Lys Arg Glu Asp Ile Phe Val		10
65 70 75 80		
tgc acc aag gtg tgg aac cac ctc cac cgt tat gag gac gtc ctc tgg	288	
Cys Thr Lys Val Trp Asn His Leu His Arg Tyr Glu Asp Val Leu Trp		
85 90 95		
tcc att gac gac tcc ctg aag cgt ctt gga ctt gac tac gtt gat atg	336	20
Ser Ile Asp Asp Ser Leu Lys Arg Leu Gly Leu Asp Tyr Val Asp Met		
100 105 110		
ttc ctc gtt cac tgg ccc att gct gcc gag aag aat ggc cag ggt gag	384	
Phe Leu Val His Trp Pro Ile Ala Ala Glu Lys Asn Gly Gln Gly Glu		
115 120 125		30
ccc aag att ggc cct gac ggc aaa tac gtc att ctc aag gac ctg acc	432	
Pro Lys Ile Gly Pro Asp Gly Lys Tyr Val Ile Leu Lys Asp Leu Thr		
130 135 140		
gag aac ccc gag ccc aca tgg cgc gct atg gag aag att tat gag gat	480	
Glu Asn Pro Glu Pro Thr Trp Arg Ala Met Glu Lys Ile Tyr Glu Asp		
145 150 155 160		40

cgc aag gcc agg tcc att ggt gtc tcc aac tgg acc att gcc gac ctt	528	
Arg Lys Ala Arg Ser Ile Gly Val Ser Asn Trp Thr Ile Ala Asp Leu		
165	170	175
gag aag atg tcc aag ttc gcc aag gtc atg cct cac gcc aac cag atc	576	
Glu Lys Met Ser Lys Phe Ala Lys Val Met Pro His Ala Asn Gln Ile		
180	185	190
gag att cac ccc ttc ctg ccc aac gag gag ctg gtg cag tac tgc ttc	624	
Glu Ile His Pro Phe Leu Pro Asn Glu Glu Leu Val Gln Tyr Cys Phe		
195	200	205
icc aag aac att atg ccc gtg gcc tac tct cct ctg ggc tgc cag aac	672	
Ser Lys Asn Ile Met Pro Val Ala Tyr Ser Pro Leu Gly Ser Gln Asn		20
210	215	220
cag gtt ccc acc acc ggt gag cgg gtc agc gag aac aag act ctg aac	720	
Gln Val Pro Thr Thr Gly Glu Arg Val Ser Glu Asn Lys Thr Leu Asn		
225	230	235 240
gag atc gcc gag aag ggc ggc aac acc ctt gct cag gtt ctt att gcc	768	30
Glu Ile Ala Glu Lys Gly Gly Asn Thr Leu Ala Gln Val Leu Ile Ala		
245	250	255
igg ggt ctg cgc cgt ggc tac gtc gtt ctc ccc aag agc tcc aac ccc	816	
Trp Gly Leu Arg Arg Gly Tyr Val Val Leu Pro Lys Ser Ser Asn Pro		
260	265	270
aag cgc att gag tcc aac ttc aag agc att gag ctc tcc gat gcc gac	864	40

Lys Arg Ile Glu Ser Asn Phe Lys Ser Ile Glu Leu Ser Asp Ala Asp  
 275 280 285

ttt gaa gcc atc aat gcc gtt gcc aag ggt cgt cac ttc cgt ttc gtc 912  
 Phe Glu Ala Ile Asn Ala Val Ala Lys Gly Arg His Phe Arg Phe Val  
 290 295 300

aac atg aag gat act ttc gga tat gat gtc tgg ccc gag gag acc gcc 960  
 Asn Met Lys Asp Thr Phe Gly Tyr Asp Val Trp Pro Glu Glu Thr Ala  
 305 310 315 320

aag aac ctg tct gcg tga 978  
 Lys Asn Leu Ser Ala  
 325

10

20

<210> 5

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 5

gccatggcta gaaggcgt cagtac 27

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

30

40

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 6

cggatccgtc atcgaggcgt gcagctagc

29

10

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 7

gccatggcta tgtctaacgg aaagact

27

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer for PCR

<400> 8

cggatccgtt ataatttcgt agagattca

29

40

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 R 1:07 )	C 1 2 R 1:07	
( C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:15 )	C 1 2 R 1:15	
( C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:38 )	C 1 2 R 1:38	
( C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:465 )	C 1 2 R 1:465	
( C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:72 )	C 1 2 R 1:72	
( C 1 2 P 7/62	C 1 2 P 7/62	
C 1 2 R 1:80 )	C 1 2 R 1:80	

Fターム(参考) 4B024 AA03 BA08 CA04 DA06 EA04 GA11 HA08  
 4B064 AD64 CA02 CA19 CB18 CC24 CD05 DA20