

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6870102号
(P6870102)

(45) 発行日 令和3年5月12日(2021.5.12)

(24) 登録日 令和3年4月16日(2021.4.16)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 15/53 (2006.01)	C 1 2 N 15/53 Z N A
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63 Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21

請求項の数 16 (全 32 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-544952 (P2019-544952)	(73) 特許権者	519153006
(86) (22) 出願日	平成28年11月4日 (2016.11.4)		アシムケム ラボラトリーズ (ティエン
(65) 公表番号	特表2019-533481 (P2019-533481A)		ジン) カンパニー リミテッド
(43) 公表日	令和1年11月21日 (2019.11.21)		ASYMCHEM LABORATORI
(86) 国際出願番号	PCT/CN2016/104670		ES (TIANJIN) CO., L
(87) 国際公開番号	W02018/082030		TD.
(87) 国際公開日	平成30年5月11日 (2018.5.11)		中華人民共和国, 300457 ティエン
審査請求日	平成31年4月25日 (2019.4.25)		ジン ティーイーディーイー, サード ア
			ベニュー ドンティン ナンバー6

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プロリン水酸化酵素及びその応用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

SEQ ID NO: 2 に示すアミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が突然変異され、且つプロリン水酸化酵素活性を有するタンパク質、を含み、

前記突然変異のアミノ酸部位が、Y 3 5 W、Y 3 5 K、I 3 9 K、I 3 9 R、H 1 1 9 R、K 1 2 3 D、E 2 7 K + Y 3 5 W / K (「 / 」は「または」を表す)、E 2 7 K + I 3 9 K / R、E 2 7 K + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + N 1 6 5 H、I 3 9 K / R + Y 3 5 W / K、I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S、I 3 9 K / R + N 1 6 5 H、K 1 2 3 D + W 4 0 F、K 1 2 3 D + Y 3 5 W / K、E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S、K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6 5 H、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V、E 2 7 K + Y 3 5 W / K + I 3 9 K / R、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R、E 2 7 K + I 3 9 K / R + D 3 0 S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + I 1 1 8 F / V / R、E 2 7 K + I 3 9 K / R + I 9 8 V、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V + N 1 6 5 H、Y 3 5 W / K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + W 4 0 F、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K + Y 3 5 W / K + S 3 7 C / E / F / N / W / T、E 2 7 K + I 3 9 K / R + S 3 7 C / E / F / N / W / T + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 0 6 Q + K 1 1 2 E、E 2 7 K + I 3 9 K / R + Y 3 5 W / K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 5 8 A / C / R / S /

10

20

T / V / Y、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V + K 1 2 3 D / I /
 Q / S、 S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 2 2 3 V + K 1 2 3 D / I /
 Q / S、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q
 / S + I 9 8 V、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D
 / I / Q / S + I 2 2 3 V、 F 2 6 L + E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q /
 S、 I 2 2 3 V + S 3 7 C / E / F / N / W / T + E 2 7 K + I 3 9 K / R、 I 2 2 3 V
 + S 3 7 C / E / F / N / W / T + E 2 7 K + N 1 6 5 H、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F
 / N / W / T + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、 K 1 0
 6 Q + K 1 1 2 E + I 2 2 3 V、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K /
 R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 1 2 3 D / I / Q / S、 H 1 4 R + E 3 4 G 10
 + K 1 0 6 Q + K 1 1 2 E + I 2 2 3 V、 T 2 5 G / R + E 2 7 K + S 3 7 C / E / F /
 N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、 E 2 7 K + S 3 7 C /
 E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 8 6 P、 K
 1 2 3 D / I / Q / S + Y 3 5 W / K + I 1 2 0 V、 E 2 7 K + D 3 0 S + I 3 9 K / R
 + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 1 1 2 E、 S 3 7 C / E / F / N / W / T + I
 3 9 K / R + N 1 6 5 H、 E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 5 8
 A / C / R / S / T / V / Y + I 2 2 3 V、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T +
 I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G、 E 2 7 K + S 3 7 C /
 E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G +
 I 1 1 8 F / V / R、 E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W 20
 / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、 E 2 7 K + E 3 4 N / G / L
 / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T /
 V / Y + D 1 7 3 G、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8
 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S、 E 2 7 K + S 3 7
 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3
 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 1 1 8 F / V / R、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N /
 W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D /
 I / Q / S + N 1 6 5 H、 E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N
 / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / 30
 I / Q / S、 H 1 4 R + E 2 7 K + D 3 0 S + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R
 + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、 T 2 5 G / R + E 2 7
 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y
 + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 1 1 8 F / V / R + N 1 6 5 H、 H 1 4 R +
 E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q +
 K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7
 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E /
 R + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + Y 3 5 W / K + I 3
 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E
 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K
 1 1 2 E / R + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / 40
 G / L / D + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + I 9 8 V + K 1 0 6 V
 / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V または H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L /
 D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 1 1 8 F /
 V / R + I 2 2 3 V、 から選ばれることを特徴とするプロリン水酸化酵素。

【請求項 2】

請求項 1 に記載のプロリン水酸化酵素をコーディングすることを特徴とする DNA 分子。

【請求項 3】

請求項 2 に記載の DNA 分子が接続されたことを特徴とする組換えプラスミド。

【請求項 4】

10

20

30

40

50

pET-21b(+), pET-22b(+), pET-3a(+), pET-3d(+), pET-11a(+), pET-12a(+), pET-14b(+), pET-15b(+), pET-16b(+), pET-17b(+), pET-19b(+), pET-20b(+), pET-21a(+), pET-23a(+), pET-23b(+), pET-24a(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a(+), pET-29a(+), pET-30a(+), pET-31b(+), pET-32a(+), pET-35b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a(+), pET-41b(+), pET-42a(+), pET-43a(+), pET-43b(+), pET-44a(+), pET-49b(+), pQE2, pQE9, pQE30, pQE31, pQE32, pQE40, pQE70, pQE80, pRSET-A, pRSET-B, pRSET-C, pGEX-5X-1, pGEX-6p-1, pGEX-6p-2, pBV220, pBV221, pBV222, pTrc99A, pTwin1, pEZZ18, pKK232-18, pUC-18, pUC-19から選ばれることを特徴とする請求項3に記載の組換えプラスミド。

10

【請求項5】

請求項3または4に記載の組換えプラスミドを含むことを特徴とする宿主細胞。

【請求項6】

前記宿主細胞が原核細胞または真核細胞であることを特徴とする請求項5に記載の宿主細胞。

20

【請求項7】

前記真核細胞が酵母細胞であることを特徴とする請求項6に記載の宿主細胞。

【請求項8】

前記宿主細胞が受容性細胞であることを特徴とする請求項6に記載の宿主細胞。

【請求項9】

前記受容性細胞が大腸菌BL21細胞または大腸菌W3110であることを特徴とする請求項6に記載の宿主細胞。

【請求項10】

L-プロリン誘導体を基質とし、プロリン水酸化酵素で前記基質のヒドロキシ化を触媒して、式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得、

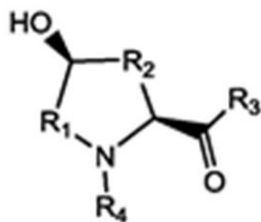
前記プロリン水酸化酵素は、(a)SEQ ID NO:2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質、または、(b)SEQ ID NO:2に示すアミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が突然変異され、且つプロリン水酸化酵素活性を有するタンパク質、であり、

30

前記突然変異のアミノ酸部位が、H14、S16、T25、F26、E27、D30、S33、E34、Y35、S37、I39、W40、K41、D54、H55、S57、I58、K86、T91、F95、C97、I98、K106、F111、K112、K162、L166、I118、H119、I120、K123、T130、D134、V135、S154、N165、D173、K209、I223、S225から選ばれる一つまたは複数であることを特徴とするL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法。

【化1】

40



.....式(I)

(ここで、R1はC1~C5のアルキリデン基またはC2~C5のアルケニレン基から選ばれ、R2はC0~C4のアルキリデン基またはC2~C4のアルケニレン基から選ばれ、R3はヒドロキシ、アミノ、C1~C6のアルコキシ基、アリアルオキシ基、C1~C

50

6のアルキルチオ基またはC1～C6のアリールチオ基から選ばれ、R4は水素、C1～C6のアルキル基、C2～C6のアルケニル基またはC2～C6のアルキニル基から選ばれる。)

【請求項11】

-ケトグルタル酸とO₂を共同の基質とし、鉄イオンを補助因子として、プロリン水酸化酵素で前記基質のヒドロキシ化を触媒して、前記L-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることが含むことを特徴とする請求項10に記載のL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法。

【請求項12】

前記L-ヒドロキシプロリン誘導体がシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンまたは(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸であることを特徴とする請求項10または11に記載のL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法。

10

【請求項13】

前記プロリン水酸化酵素が、5～45の反応温度で前記基質のヒドロキシ化を触媒して、前記式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることを特徴とする請求項10または11に記載のL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法。

【請求項14】

前記プロリン水酸化酵素が、5～15の反応温度で前記基質のヒドロキシ化を触媒して、前記式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることを特徴とする請求項10または11に記載のL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法。

20

【請求項15】

前記突然変異が、H14R、S16N、T25G、T25R、F26L、E27K、D30S、S33N、E34N、E34G、E34L、E34S、E34D、Y35W、Y35K、S37W、S37F、S37E、S37N、S37T、S37C、I39K、I39R、W40F、K41E、D54G、H55Q、S57L、I58T、I58Y、I58A、I58R、I58V、I58S、I58C、K86P、T91A、F95Y、C97Y、I98V、K106V、K106T、K106Q、F111S、K112E、K112R、S154A、K162E、L166M、I118F、I118V、I118R、H119R、H119F、I120V、K123D、K123N、K123Q、K123S、K123I、K123T、T130N、D134G、V135K、N165H、D173G、K209R、I223V、S225Aのうちの一つまたは複数を含むことを特徴とする請求項10に記載のL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法。

30

【請求項16】

前記突然変異が、E27K+Y35W/K(「/」は「または」を表す)、E27K+I39K/R、E27K+K123D/I/Q/S、E27K+N165H、I39K/R+Y35W/K、I39K/R+K123D/I/Q/S、I39K/R+N165H、K123D+W40F、K123D+Y35W/K、E27K+I39K/R+K123D/I/Q/S、K123D/I/Q/S+N165H、S37C/E/F/N/W/T+I223V、E27K+Y35W/K+I39K/R、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R、E27K+E34N/G/L/D/S+I39K/R、E27K+I39K/R+D30S、E27K+I39K/R+I118F/V/R、E27K+I39K/R+I98V、S37C/E/F/N/W/T+I223V+N165H、Y35W/K+S37C/E/F/N/W/T+W40F、S37C/E/F/N/W/T+I223V+K123D/I/Q/S、E27K+I39K+Y35W/K+S37C/E/F/N/W/T、E27K+I39K/R+S37C/E/F/N/W/T+K123D/I/Q/S、E27K+I39K/R+K106Q+K112E、E27K+I39K/R+Y35W/K+S37C/E/F/N/W/T+K123D/I/Q/S、E27K+I39K/R+S37C/E/F/N/W/T+I58A/C/R/S/T/V/Y、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I223V+K123D/I/Q/S、S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I223V+K123D/I

40

50

/ Q / S、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I /
 Q / S + I 9 8 V、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + K 1 2 3
 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、F 2 6 L + E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q
 / S、I 2 2 3 V + S 3 7 C / E / F / N / W / T + E 2 7 K + I 3 9 K / R、I 2 2 3
 V + S 3 7 C / E / F / N / W / T + E 2 7 K + N 1 6 5 H、E 2 7 K + S 3 7 C / E /
 F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、K 1
 0 6 Q + K 1 1 2 E + I 2 2 3 V、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K
 / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9
 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6 5 H、H 1 4 R + E 3 4 G + K 1 0 6 Q + K 1
 1 2 E + I 2 2 3 V、T 2 5 G / R + E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9
 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T
 + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 8 6 P、K 1 2 3 D / I / Q /
 S + Y 3 5 W / K + I 1 2 0 V、E 2 7 K + D 3 0 S + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R
 / S / T / V / Y + K 1 1 2 E、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + N 1 6
 5 H、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T
 / V / Y + I 2 2 3 V、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5
 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T
 + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + I 1 1 8 F / V / R
 、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R
 + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C
 / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G
 、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T
 / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W
 / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I
 / Q / S + I 1 1 8 F / V / R、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K /
 R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6
 5 H、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K
 / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S、H 1 4
 R + E 2 7 K + D 3 0 S + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0
 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、T 2 5 G / R + E 2 7 K + S 3 7 C / E /
 F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1
 2 3 D / I / Q / S + I 1 1 8 F / V / R + N 1 6 5 H、H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N
 / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I
 2 2 3 V、H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W
 / T + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、H
 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + Y 3 5 W / K + I 3 9 K / R + I 9 8 V
 + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N /
 G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + K 1
 2 3 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D + I 3 9
 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2
 E / R + I 2 2 3 V、H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R +
 I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 1 1 8 F / V / R + I 2 2 3 Vとい
 う組み合わせのいずれか1つを含むことを特徴とする請求項10に記載のL-ヒドロキシ
 プロリン誘導体の生産方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、遺伝子工学と酵素工学に関し、特に、プロリン水酸化酵素及びその応用に関
する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【0002】

プロリンの誘導体は薬物合成における重要な構成ユニットで、特に、ヒドロキシプロリンは自然においてまれなアミノ酸であって、多くの重要な薬物の合成における開始原料である。プロリンの水酸化部位及び空間的構造の違いにより、ヒドロキシプロリンは合計で8種類の異性体があり、その中において、3-ヒドロキシ-L-プロリンと4-ヒドロキシ-L-プロリンは、抗生物質、酵素阻害剤、抗腫瘍、抗高血圧及び新規の胃薬等の様々な薬物の重要な原料であって、今、生物合成の研究の注目点になった。その他、ヒドロキシプロリンは天然産物から得られるものまたは化学合成されるものであることもでき、例えば植物材料とコラーゲンの加水分解物、または臭化アリルとジエチルアセチルアミノマロン酸、D-グルタミン酸とL-アラニンを開始原料として化学合成される。

10

【0003】

同様に、ヒドロキシプロリンの誘導体であるL-ヒドロキシピペリジン酸も薬物の合成における重要な構成ユニットで、L-ラクタム酵素阻害剤とTNF- α 変換酵素阻害剤の合成における重要な中間体である。L-ヒドロキシピペリジン酸も植物または他の自然材料の分離または化学合成の方法で調製できる。しかし、複雑な分離純化方法または複雑な合成工程が必要で、大量の産業化生産の実現は難しい。水酸化酵素でピペリジン酸をヒドロキシ化する方法はヒドロキシピペリジン酸を得る望ましい方法である。現在、最も応用されている酵素はプロリン水酸化酵素で、それはケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼであって、L-ケトグルタル酸とO₂を共同の基質とし、鉄イオンを補助因子とする。

【0004】

多くの微生物にはいずれもプロリン水酸化酵素が含まれていて、例えばシノリゾビウム・メリロティ(*Sinorhizobium meliloti*)、ストレプトマイセス菌TH1 (*Streptomyces* sp. strain TH1)及び糸状真菌*Glaresia lozoyensis*等がある。常用のものとして、シス-プロリン-3-水酸化酵素、シス-プロリン-4-水酸化酵素、トランス-プロリン-4-水酸化酵素の3種類が挙げられ、それぞれ、シス-3-ヒドロキシ-L-プロリン、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリン、トランス-4-ヒドロキシ-L-プロリンを発生するようにL-プロリンを触媒できる。しかし、プロリン水酸化酵素によるプロリン及びプロリン誘導体の触媒反応において、例えば変換率が低く、位置異性体の発生を触媒する等の無視できない問題が存在するため、大規模な産業生産を実現できない。シノリゾビウム・メリロティ(*Sinorhizobium meliloti*)からのシス-プロリン-4-水酸化酵素は遺伝子改変によって、L-ピペリジン酸に対するヒドロキシ化作用の変換率と酵素触媒の特異度がいずれも大幅に向上されたが、依然として10%の位置異性体である(2S,3R)-3-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸が発生される(WO2013169725A2)。よって、プロリン及びプロリン誘導体のヒドロキシ化作用を特異的で高速に触媒できる酵素を探し出すことは、ヒドロキシプロリン及びその誘導体の産業合成に重要な意味を持つことになる。

20

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、既存技術においてプロリン水酸化酵素が触媒の選択性が低い問題を解決できるプロリン水酸化酵素及びその応用を提供することを主な目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0006】

上述した目的を実現するため、本発明の一態様によると、(a)SEQ ID NO:2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と、(b)SEQ ID NO:2に示すアミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が突然変異され、且つプロリン水酸化酵素活性を有するタンパク質と、または(c)(b)中の一つまたは複数のアミノ酸の突然変異を保留し、プロリン水酸化酵素活性を有し、且つ(b)中のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも78%の相同性を有するタンパク質と、を含むプロリン水酸化酵素を提供する。

【0007】

50

さらに、突然変異したアミノ酸部位が、H14、S16、T25、F26、E27、D30、S33、E34、Y35、S37、I39、W40、K41、D54、H55、S57、I58、K86、T91、F95、C97、I98、K106、F111、K112、K162、L166、I118、H119、I120、K123、T130、D134、V135、S154、N165、D173、K209、I223、S225から選ばれる一つまたは複数である。

【0008】

さらに、突然変異は、H14R、S16N、T25G、T25R、F26L、E27K、D30S、S33N、E34N、E34G、E34L、E34S、E34D、Y35W、Y35K、S37W、S37F、S37E、S37N、S37T、S37C、I39K、I39R、W40F、K41E、D54G、H55Q、S57L、I58T、I58Y、I58A、I58R、I58V、I58S、I58C、K86P、T91A、F95Y、C97Y、I98V、K106V、K106T、K106Q、F111S、K112E、K112R、S154A、K162E、L166M、I118F、I118V、I118R、H119R、H119F、I120V、K123D、K123N、K123Q、K123S、K123I、K123T、T130N、D134G、V135K、N165H、D173G、K209R、I223V、S225Aのうちいずれか一つまたは複数を含む。

10

【0009】

さらに、突然変異は、E27K+Y35W/K、E27K+I39K/R、E27K+K123D/I/Q/S、E27K+N165H、I39K/R+Y35W/K、I39K/R+K123D/I/Q/S、I39K/R+N165H、K123D+W40F、K123D+Y35W/K、E27K+I39K/R+K123D/I/Q/S、K123D/I/Q/S+N165H、S37C/E/F/N/W/T+I223V、E27K+Y35W/K+I39K/R、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R、E27K+E34N/G/L/D/S+I39K/R、E27K+I39K/R+D30S、E27K+I39K/R+I118F/V/R、E27K+I39K/R+I98V、S37C/E/F/N/W/T+I223V+N165H、Y35W/K+S37C/E/F/N/W/T+W40F、S37C/E/F/N/W/T+I223V+K123D/I/Q/S、E27K+I39K+Y35W/K+S37C/E/F/N/W/T、E27K+I39K/R+S37C/E/F/N/W/T+K123D/I/Q/S、E27K+I39K/R+K106Q+K112E、E27K+I39K/R+Y35W/K+S37C/E/F/N/W/T+K123D/I/Q/S、E27K+I39K/R+S37C/E/F/N/W/T+I58A/C/R/S/T/V/Y、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I223V+K123D/I/Q/S、S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I223V+K123D/I/Q/S、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+K123D/I/Q/S+I98V、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+K123D/I/Q/S+I223V、F26L+E27K+I39K/R+K123D/I/Q/S、I223V+S37C/E/F/N/W/T+E27K+I39K/R、I223V+S37C/E/F/N/W/T+E27K+N165H、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I98V+K123D/I/Q/S+I223V、K106Q+K112E+I223V、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I58A/C/R/S/T/V/Y+K123D/I/Q/S、E27K+I39K/R+K123D/I/Q/S+N165H、H14R+E34G+K106Q+K112E+I223V、T25G/R+E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I58A/C/R/S/T/V/Y、E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I58A/C/R/S/T/V/Y+K86P、K123D/I/Q/S+Y35W/K+I120V、E27K+D30S+I39K/R+I58A/C/R/S/T/V/Y+K112E、S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+N165H、E27K+E34N

20

30

40

50

/ G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + I 2 2 3 V、 E
 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V
 / Y + D 1 7 3 G、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A
 / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + I 1 1 8 F / V / R、 E 2 7 K + E 3 4 N / G
 / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S /
 T / V / Y、 E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I
 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G、 E 2 7 K + S 3 7 C / E
 / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K
 1 2 3 D / I / Q / S、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5
 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 1 1 8 F / V
 / R、 E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S
 / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6 5 H、 E 2 7 K + E 3 4 N
 / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R /
 S / T / V / + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S、 H 1 4 R + E 2 7 K + D 3 0 S +
 E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E
 / R + I 2 2 3 V、 T 2 5 G / R + E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9
 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + I
 1 1 8 F / V / R + N 1 6 5 H、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3
 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E
 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I
 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3
 4 N / G / L / D / S + Y 3 5 W / K + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q +
 K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9
 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + K 1 2 3 D / I / Q / S + I
 2 2 3 V、 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C /
 R / S / T / V / Y + I 9 8 V + K 1 0 6 V / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 2 2 3 V 及び
 H 1 4 R + E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 0 6 V
 / T / Q + K 1 1 2 E / R + I 1 1 8 F / V / R + I 2 2 3 V という組み合わせのいずれ
 か一つを含み、ここで、「/」は「または」を示す。

10

20

【0010】

上述した目的を実現するため、本発明の一態様によると、上述したいずれかのプロリン
 水酸化酵素をコーディングするDNA分子を提供する。

30

【0011】

上述した目的を実現するため、本発明の他の一態様によると、上記DNA分子が接続さ
 れた組換えプラスミドを提供する。

【0012】

さらに、組換えプラスミドは、pET-21b(+)、pET-22b(+)、pET-3a(+)
 (+)、pET-3d(+)、pET-11a(+)、pET-12a(+)、pET-14b(+)、p
 ET-15b(+)、pET-16b(+)、pET-17b(+)、pET-19b(+)、pET
 -20b(+)、pET-21a(+)、pET-23a(+)、pET-23b(+)、pET-2
 4a(+)、pET-25b(+)、pET-26b(+)、pET-27b(+)、pET-28a
 (+)、pET-29a(+)、pET-30a(+)、pET-31b(+)、pET-32a(+)
 、pET-35b(+)、pET-38b(+)、pET-39b(+)、pET-40b(+)、p
 ET-41a(+)、pET-41b(+)、pET-42a(+)、pET-43a(+)、pET
 -43b(+)、pET-44a(+)、pET-49b(+)、pQE2、pQE9、pQE3
 0、pQE31、pQE32、pQE40、pQE70、pQE80、pRSET-A、
 pRSET-B、pRSET-C、pGEX-5X-1、pGEX-6p-1、pGEX-6p-
 2、pBV220、pBV221、pBV222、pTrc99A、pTwin1、pE
 ZZ18、pKK232-18、pUC-18、pUC-19から選ばれる。

40

【0013】

50

本発明の他の一態様によると、上述したいずれかの組換えプラスミドを含む宿主細胞を提供する。

【0014】

さらに、宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であって、真核細胞が酵母細胞であることが好ましい。

【0015】

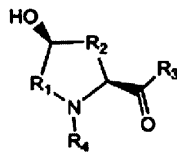
さらに、宿主細胞は、受容性細胞であって、受容性細胞が大腸菌 B L 2 1 細胞または大腸菌 W 3 1 1 0 であることが好ましい。

【0016】

本発明の他の一態様によると、L-プロリン誘導体を基質とし、上記のうちのいずれかに記載のプロリン水酸化酵素で基質のヒドロキシ化を触媒して、一般式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得るL-ヒドロキシプロリン誘導体の生産方法を提供する。

【0017】

【化1】



.....式(I)

【0018】

ここで、 R_1 は $C_1 \sim C_5$ のアルキリデン基または $C_2 \sim C_5$ のアルケニレン基から選ばれ、 R_2 は $C_0 \sim C_4$ のアルキリデン基または $C_2 \sim C_4$ のアルケニレン基から選ばれ、 R_3 はヒドロキシ、アミノ、 $C_1 \sim C_6$ のアルコキシ基、アリールオキシ基、 $C_1 \sim C_6$ のアルキルチオ基または $C_1 \sim C_6$ のアリールチオ基から選ばれ、 R_4 は水素、 $C_1 \sim C_6$ のアルキル基、 $C_2 \sim C_6$ のアルケニル基または $C_2 \sim C_6$ のアルキニル基から選ばれる。

【0019】

さらに、該方法は、 α -ケトグルタル酸と O_2 を共同の基質とし、鉄イオンを補助因子として、プロリン水酸化酵素で基質のヒドロキシ化を触媒して、L-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることが含む。

【0020】

さらに、L-ヒドロキシプロリン誘導体は、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリンまたは(2S, 5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸である。

【0021】

さらに、プロリン水酸化酵素は、 $5 \sim 45$ の反応温度で、好ましくは $5 \sim 15$ の反応温度で、基質のヒドロキシ化を触媒して、一般式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得る。

【発明の効果】

【0022】

本発明の技術案によると、SEQ ID NO: 2 を基礎配列として、さらに遺伝子工学手段によって改善された後の一つまたは複数のアミノ酸残基の変化を含む突然変異体またはこれらの突然変異を保留した前提で他のアミノ酸部位を変化させることで変化後のアミノ酸配列が(b)中のアミノ酸配列と少なくとも78%の相同性を有するタンパク質を選択することによって、既存のプロリン水酸化酵素より高い触媒特異度(即ち、選択性)を有し、または本発明で見つかった野生型水酸化酵素(即ち、アミノ酸配列がSEQ ID NO: 2 であるプロリン水酸化酵素)より明確に向上された触媒活性を有する。

【図面の簡単な説明】

【0023】

【図1】本発明に係るプロリン水酸化酵素で触媒して合成した(2S, 5S)-5-ヒドロキ

10

20

30

40

50

シピペリジン-2-カルボキシル酸(シス-5-ヒドロキシピペリジン酸とも呼ばれる)の化学反応過程を示す。

【図2】本発明に係るプロリン水酸化酵素で触媒して合成したシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンの化学反応方程式である。

【発明を実施するための形態】

【0024】

発明の一部を構成する図面は本発明を一層理解させるためのもので、本発明の示意的実施例及びその説明は本発明を解釈するもので、本発明を限定するものではない。

【0025】

なお、矛盾しない限り、本願の実施例及び実施例中の特徴は互いに組み合わせられることができる。以下、図面を参照しつつ実施例を結合して本発明を説明する。

10

【0026】

名称解釈

酵素の選択性は、酵素の特異度ともよばれ、酵素が生化学反応を触媒する際に基質に対する選択性を指す。本発明において、プロリン水酸化酵素の選択性とは、プロリン水酸化酵素がL-プロリン誘導体のヒドロキシ化を触媒して、特定の分子構造のL-ヒドロキシプロリン誘導体を得る程度を指す。この説明に係る反応において、反応するジアステレオマー過剰率で当該水酸化酵素の触媒選択性の程度を表すことができる。

【0027】

変換率とは、ある反応物に変換されるパーセンテージまたは割合を指す。変換率は、反応物の反応程度を表す指標である。本発明において、L-ピペリジン酸ヒドロキシ化の作用における変換率とは、水酸化酵素またはプロリン水酸化酵素がL-ピペリジン酸反応を触媒するにおいて、生産される製品である(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸が体系におけるL-ピペリジン酸に占めるパーセンテージを指す。

20

【0028】

触媒活性とは、単位あたりの容積(または質量)の触媒が単位時間内に原料反応物を変換させる数を指す。本発明において、プロリン水酸化酵素の触媒活性のレベルは本発明に記載の反応の変換率と正の相関関係を持つ。

【0029】

進化とは、突然変異または組換え等の手段で分子の多様性を構成し、その後、これらの多様性を選別して、新規の機能を有する遺伝子またはDNAを得ることを指す。本発明において、突然変異または組換え等の手段で水酸化酵素またはプロリン水酸化酵素を改善して、性能が高められた水酸化酵素またはプロリン水酸化酵素を得る。

30

【0030】

ジアステレオマーとは、分子が2つまたは複数のキラル中心を有し、分子間が非鏡像体の関係である立体異性体を指す。

【0031】

ジアステレオマー過剰率(diastereomeric excess、de%と略称)とは、2つのキラル中心である場合、一つのジアステレオマーが他のエナンチオマーに対して過剰であることを指す。即ち、 $de\% = (R,R + S,S) - (S,R + R,S) / (R,R + S,S + S,R + R,S)$ である。

40

【0032】

野生型とは、自然から取得した、人為的な変異誘発または改善がないことを指す。本発明において、野生型プロリン水酸化酵素とは、GeneBankから選別して得た天然の人為的に改善されていない遺伝子配列をコーディングして得たプロリン水酸化酵素を指す。

【0033】

相同配列とは、同種物質の異なる個体間または異なる種類の物質間の同一または類似するDNA配列を指す。

【0034】

50

本発明において、係る 1 w t はいずれも、1 g の主原料の変換に 1 g のプロリン水酸化酵素変異体組換えウェット細胞が必要であることを指す。

【 0 0 3 5 】

背景技術部分に記載のように、既存技術におけるプロリン水酸化酵素には触媒選択性が高くない問題があって、後続の目標産物の分離が難しくなる。既存技術においてプロリン水酸化酵素の選択性が高くない問題を解決するため、発明者は遺伝子工学の手段で、触媒特異度の高いプロリン水酸化酵素を得た。同時に、発明者は既存の野生型プロリン水酸化酵素に各種の突然変異による改善を行って、選択性が高く、且つ触媒活性が向上されたプロリン水酸化酵素を得ようとした。

【 0 0 3 6 】

発明者は、Gene bank から無数の既存のプロリン水酸化酵素のアミノ酸配列の相同配列を選別し、相同性の高い順で、選別された各種の相同配列に異なる部位の遺伝子突然変異を行い、各種の突然変異体の水酸化酵素の活性を選別した。その結果、相同性配列の高い配列に突然変異を行って得た突然変異体のプロリン水酸化酵素の活性はいずれも、既存のプロリン水酸化酵素と明確な差異を表していない。最後に、既存のプロリン水酸化酵素のアミノ酸配列との相同性が最も低い(30%程度しかない)Kordia jejudonensis からの一つの配列のみが残っており、該配列はGene bank において明確な遺伝子機能注釈がなく、仮説タンパク質と注釈された。発明者は、遺伝子工学技術で該配列に組換え発現を行った結果、該配列でコーディングされたタンパク質が、プロリン水酸化酵素活性を有し、また既存技術におけるプロリン水酸化酵素より高い選択性を有することを発見した。発明者は、該タンパク質を野生型プロリン水酸化酵素と命名した。発明者は、該野生型水酸化酵素のアミノ酸配列に突然変異試験を行った結果、該Kordia jejudonensis からの配列を突然変異した後に取得した突然変異体はプロリン水酸化酵素活性を有するとともに、触媒活性も野生型プロリン水酸化酵素より明確に向上されることを発見した。

【 0 0 3 7 】

さらに、発明者は、該配列を基礎配列として各種の突然変異選別を行って、最終的に複数の突然変異部位がプロリン水酸化酵素の活性と関連することを見つけた。これらの突然変異部位を保留した前提で、任意の他の部位の突然変異を変化してもプロリン水酸化酵素の活性に明確な影響は与えないことを見つけた。

【 0 0 3 8 】

上記を基に、発明者は一層研究したところ、突然変異されたら、プロリン水酸化酵素の可溶性発現を明確に低下させ、またはプロリン水酸化酵素の触媒活性を失わせる幾つかの重要な氨基酸残基部位を見つけた。S3、L94、H105、D107、S131、E132、Y137、M139、W145、H153、N157、V167、D169アミノ酸残基部位が他の大部分のアミノ酸に突然変異した後、プロリン水酸化酵素の可溶性発現は明確に低下し、一部はゼロになった。これらのアミノ酸の突然変異は、プロリン水酸化酵素の折りたたみに影響を及ぼし、E.Coli 宿主細胞中の可溶性発現量を明確に減少させ、ひいては可溶性発現がゼロまで減少し、その突然変異のアミノ酸は、Y35A、Y35F、Y35S、W40Y、L94A、L94G、L94S、F95A、F95W、H105R、H105Q、H105E、H105G、R117A、R117P、R117K、P121V、V135A、S131T、H153Y、H153A、H153R、H153K から選ばれることができる。同時に、Y32、R93、R117、Y108アミノ酸残基部位が他の大部分のアミノ酸に突然変異した後、プロリン水酸化酵素触媒活性を失ってしまうことを見つけた。このようなプロリン水酸化酵素の触媒活性を明確に低減し、ひいては活性を喪失してしまう突然変異アミノ酸は、Y32N、Y32V、Y32V、Y32Q、Y32E、Y32S、Y32R、Y32D、Y32R、Y32I、Y32P、Y35H、Y35F、Y35A、W40Y、R93K、R93H、R93E、R93A、L94A、F95W、F95A、H105E、H105Q、H105R、H105K、H105A、K106H、D107A、Y108W、Y108A、Y108L、Y108S、

10

20

30

40

50

Y 1 0 8 P、R 1 1 7 D、R 1 1 7 P、R 1 1 7 N、R 1 1 7 H、R 1 1 7 K、R 1 1 7 A、P 1 2 1 V、H 1 5 3 W、H 1 5 3 F、H 1 5 3 K、H 1 5 3 R、H 1 5 3 Aから選ばれる。

【 0 0 3 9 】

プロリン水酸化酵素の三次元構造をコンピュータで模擬して三次元構造図を得た。該構造図を分析した後、上述した部位のほとんどがプロリン水酸化酵素と基質の結合またはプロリン水酸化酵素と補助因子の結合に参加した重要なアミノ酸残基であると推定し、例えばH 1 0 5、D 1 0 7、H 1 5 3は補助因子とプロリン水酸化酵素の結合に参加し、Y 3 2、R 9 3、R 1 1 7は基質とプロリン水酸化酵素の結合に参加した可能性があり、ここで、R 9 3、R 1 1 7アミノ酸残基は基質と塩橋を形成する可能性がある。そして、第2 3 0 ~ 2 7 6位間のアミノ酸残基が酵素の活性関連領域外に位置するので、該区間に一部のアミノ酸を変化または除去すると、プロリン水酸化酵素の活性に対する影響をあまり大きくない。

10

【 0 0 4 0 】

本発明の突然変異体は、上述したプロリン水酸化酵素の活性に対する影響があまり大きくないアミノ酸部位を不変に保持して、残りのアミノ酸を変化して得たもので、触媒活性または選択性が向上された突然変異体である。

【 0 0 4 1 】

上記研究結果に基づいて、発明者が本発明の技術案を提示した。典型的な実施形態においてプロリン水酸化酵素を提供し、該プロリン水酸化酵素は、(a)SEQ ID NO: 2に示すアミノ酸配列を有するタンパク質と、または(b)SEQ ID NO: 2に示すアミノ酸配列の一つまたは複数のアミノ酸が突然変異され、且つプロリン水酸化酵素活性を有するタンパク質と、または(c)前記(b)中の一つまたは複数のアミノ酸の突然変異を保留し、プロリン水酸化酵素活性を有し、且つ(b)中のタンパク質のアミノ酸配列と少なくとも78%の相同性を有するタンパク質を含む。

20

【 0 0 4 2 】

上記プロリン水酸化酵素は、SEQ ID NO: 2を基礎配列として、さらに遺伝子工学手段によって改善された後の一つまたは複数のアミノ酸残基の変化を含む突然変異体またはこれらの突然変異を保留した前提で他のアミノ酸部位を変化させることで変化後のアミノ酸配列が(b)中のアミノ酸配列と少なくとも78%の相同性を有するタンパク質を選択することによって、既存の水酸化酵素より高い触媒特異度(即ち、選択性)を有し、または本発明で見つかった野生型水酸化酵素(即ち、アミノ酸配列がSEQ ID NO: 2である水酸化酵素)より明確に向上された触媒活性を有する。

30

【 0 0 4 3 】

上記プロリン水酸化酵素の触媒活性は、SEQ ID NO: 2でコーディングされた原始野生型水酸化酵素より少なくとも1倍、2倍、3倍、4倍、5倍またはさらに向上された。そして、上記プロリン水酸化酵素の選択性も、既存技術より明確に向上され、その触媒によって発生された(2S, 5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率(diastereomeric excess)は90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%を超えているまたはさらに高い。

40

【 0 0 4 4 】

一部の実施形態において、上記プロリン水酸化酵素は、SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列がH 1 4、S 1 6、T 2 5、F 2 6、E 2 7、D 3 0、S 3 3、E 3 4、Y 3 5、S 3 7、I 3 9、W 4 0、K 4 1、D 5 4、H 5 5、S 5 7、I 5 8、K 8 6、T 9 1、F 9 5、C 9 7、I 9 8、K 1 0 6、F 1 1 1、K 1 1 2、K 1 6 2、L 1 6 6、I 1 1 8、H 1 1 9、I 1 2 0、K 1 2 3、T 1 3 0、D 1 3 4、V 1 3 5、S 1 5 4、N 1 6 5、D 1 7 3、K 2 0 9、I 2 2 3及びS 2 2 5のうちの一つまたは複数のアミノ酸部位の突然変異がなされ、且つプロリン水酸化酵素活性を有するタンパク質である。ここで、水酸化酵素触媒活性に関連するアミノ酸部位は、H 1 4、S 1 6、F 2 6、E 2 7、D

50

30、S33、E34、S37、I39、W40、K41、T91、F95、C97、I98、K106、F111、K112、I118、H119、I120、K123、T130、D134、V135、N165、K209及びI223がある。そして、Y35とS57アミノ酸部位は水酸化酵素の選択性に係っている。上記一つまたは複数のアミノ酸部位の突然変異は、野生型プロリン水酸化酵素の活性または選択性に顕著な影響を与え、突然変異体のプロリン水酸化酵素触媒活性及び/または選択性を顕著に向上させることができる。

【0045】

上記プロリン水酸化酵素の三次元構造シミュレーション図をさらに分析し、本発明におけるプロリン水酸化酵素の活性部位が折りたたみに関連する領域に位置すると推定し、該領域はN-末端とC-末端のヘリックス構造によって固定される。基質結合部位は折りたたみ領域の中心に位置し、補助因子結合領域に隣接する。これらの部位を分析した結果、本発明に係っているプロリン水酸化酵素の上記突然変異アミノ酸残基がプロリン水酸化酵素の三次元構造シミュレーション図において主に基質結合部位または補助因子の結合に関する領域内に位置することを見つかり、例えば、E27、D30、S33、E34、Y35、S37、I39、W40、K41、H55、S57、I58、F95、C97、I98、F111、K112、I118、H119、I120アミノ酸はいずれも基質結合部位付近に位置する可能性があり、これらのアミノ酸の変化によって、基質結合の特異性を向上させて、酵素の活性または触媒の選択性が向上される。例えば、K106、L166、K123、D134、S154、N165アミノ酸はいずれも補助因子結合部位付近に位置する可能性があり、これらのアミノ酸の変化によって、補助因子の結合を向上させ、酸素の利用と伝達との釣り合いを保つ作用を果たして、酵素の活性を向上させる。

【0046】

上記部位が突然変異した状況で、発明者はこれらの部位を異なるアミノ酸に突然変異させて、そのプロリン水酸化酵素活性の変化を検出した結果、これらのアミノ酸部位が、以下のいずれか1種類または複数種類の組み合わせに突然変異した後、水酸化酵素の活性及び/または選択性が一層向上されることを見つかった。突然変異は、H14R、S16N、T25G、T25R、F26L、E27K、D30S、S33N、E34N、E34G、E34L、E34S、E34D、Y35W、Y35K、S37W、S37F、S37E、S37N、S37T、S37C、I39K、I39R、W40F、K41E、D54G、H55Q、S57L、I58T、I58Y、I58A、I58R、I58V、I58S、I58C、K86P、T91A、F95Y、C97Y、I98V、K106V、K106T、K106Q、F111S、K112E、K112R、S154A、K162E、L166M、I118F、I118V、I118R、H119R、H119F、I120V、K123D、K123N、K123Q、K123S、K123I、K123T、T130N、D134G、V135K、N165H、D173G、K209R、I223V及びS225Aのうちのいずれか一つまたは複数を含む。突然変異が、H14R、E27K、E34N、E34G、E34L、E34D、Y35W、Y35K、S37W、S37F、S37E、S37N、S37T、S37C、I39K、I39R、I58T、I58Y、I58A、I58R、I58V、I58S、I58C、K123D、K123N、K123Q、K123S、K123I及びK123Tのうちのいずれか一つまたは複数を含むことがさらに好ましい。ここで、プロリン水酸化酵素の選択性に関連するアミノ酸の突然変異は、Y35W、S57L、S57Vがある。

【0047】

一部のアミノ酸の突然変異は、プロリン水酸化酵素の細菌細胞中の可溶性発現量を増加でき、特に、E.Coli宿主細胞中の可溶性発現を増加させることができ、このような突然変異アミノ酸は、E27K、D30S、Y35W、Y35K、S37W、S37F、S37E、S37N、S37T、S37C、I39K、I39R、W40F、I58T、I58Y、I58A、I58R、I58V、I58S、I58C、I98V、K106V、K106T、K106Q、H119R、H119F、K123D、K123N、K12

10

20

30

40

50

3 Q、K 1 2 3 S、K 1 2 3 I、K 1 2 3 T、N 1 6 5 H、I 2 2 3 Vから選ばれる。通常、外来遺伝子を原核発現システムで見つけた場合、正確に折りたたんで形成された可溶性タンパク質のみが活性を有し、形成された封入体は活性を有しない。可溶性タンパク質の発現量が増加されて、酵素活性も総体的に増加される。

【 0 0 4 8 】

さらに好ましい実施例において、上記突然変異は、E 2 7 K + Y 3 5 W / K、E 2 7 K + I 3 9 K / R、E 2 7 K + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + N 1 6 5 H、I 3 9 K / R + Y 3 5 W / K、I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S、I 3 9 K / R + N 1 6 5 H、K 1 2 3 D + W 4 0 F、K 1 2 3 D + Y 3 5 W / K、E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S、K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6 5 H、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V、E 2 7 K + Y 3 5 W / K + I 3 9 K / R、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R、E 2 7 K + I 3 9 K / R + D 3 0 S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + I 1 1 8 F / V / R、E 2 7 K + I 3 9 K / R + I 9 8 V、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V + N 1 6 5 H、Y 3 5 W / K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + W 4 0 F、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K + Y 3 5 W / K + S 3 7 C / E / F / N / W / T、E 2 7 K + I 3 9 K / R + S 3 7 C / E / F / N / W / T + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 0 6 Q + K 1 1 2 E、E 2 7 K + I 3 9 K / R + Y 3 5 W / K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 2 2 3 V + K 1 2 3 D / I / Q / S、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 2 2 3 V + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 9 8 V、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、F 2 6 L + E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S、I 2 2 3 V + S 3 7 C / E / F / N / W / T + E 2 7 K + I 3 9 K / R、I 2 2 3 V + S 3 7 C / E / F / N / W / T + E 2 7 K + N 1 6 5 H、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 9 8 V + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 2 2 3 V、K 1 0 6 Q + K 1 1 2 E + I 2 2 3 V、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + I 3 9 K / R + K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6 5 H、H 1 4 R + E 3 4 G + K 1 0 6 Q + K 1 1 2 E + I 2 2 3 V、T 2 5 G / R + E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 8 6 P、K 1 2 3 D / I / Q / S + Y 3 5 W / K + I 1 2 0 V、E 2 7 K + D 3 0 S + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + K 1 1 2 E、S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + N 1 6 5 H、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + I 2 2 3 V、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + I 1 1 8 F / V / R、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + I 1 1 8 F / V / R、E 2 7 K + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S + N 1 6 5 H、E 2 7 K + E 3 4 N / G / L / D / S + S 3 7 C / E / F / N / W / T + I 3 9 K / R + I 5 8 A / C / R / S / T / V / Y + D 1 7 3 G + K 1 2 3 D / I / Q / S、H

14R+E27K+D30S+E34N/G/L/D/S+I39K/R+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I223V、T25G/R+E27K+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I58A/C/R/S/T/V/Y+D173G+K123D/I/Q/S+I118F/V/R+N165H、H14R+E27K+E34N/G/L/D/S+I39K/R+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I223V、H14R+E27K+E34N/G/L/D/S+S37C/E/F/N/W/T+I39K/R+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I223V、H14R+E27K+E34N/G/L/D/S+Y35W/K+I39K/R+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I223V、H14R+E27K+E34N/G/L/D/S+I39K/R+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I223V、H14R+E27K+E34N/G/L/D+I39K/R+I58A/C/R/S/T/V/Y+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I223V及びH14R+E27K+E34N/G/L/D/S+I39K/R+I98V+K106V/T/Q+K112E/R+I118F/V/R+I223Vという組み合わせの何れか1つを含む。上記突然変異組み合わせにおいて、「/」はまたはのこを表す。上記突然変異の組み合わせにおいて、Y35Wに係っている突然変異の組み合わせは、プロリン水酸化酵素の選択性に関連するものであって、その他の組み合わせはプロリン水酸化酵素の触媒活性に関連するものである。

10

【0049】

上記好適な実施例において、プロリン水酸化酵素の触媒活性の情報は該酵素によるL-ピペリジン酸に対する触媒活性に基づいて選別され、このような一層好適な実施例におけるプロリン水酸化酵素の触媒活性の結果は表1と表2に示す通りであって、DNA配列の配列番号が奇数で、アミノ酸配列の配列番号が偶数である。本発明に記載の突然変異アミノ酸は、SEQ ID NO:2のアミノ酸配列を基礎として突然変異され、SEQ ID NO:2は*Kordia jejudonensis*からの仮説タンパク質の配列である。本発明において、野生型プロリン水酸化酵素の活性を「1」で表し、突然変異体のプロリン水酸化酵素の活性を「+」で表し、「+」は活性が野生型SEQ ID NO:2の1~2倍であることを、「++」は活性が野生型SEQ ID NO:2の2~3倍であることを、「+++」は活性が野生型SEQ ID NO:2の3~4倍であることを、「++++」は活性が野生型SEQ ID NO:2の4~5倍であることを表す。

20

30

【0050】

【表 1】

表 1 単一部位の突然変異後のプロリン水酸化酵素活性の比較

番号	SEQ ID NO: (DNA /AA)	突然変異アミノ酸	活性
1	1/2	無	1
2	3/4	無	1
3	5/6	H14R	+
4	7/8	S16N	+
5	9/10	T25G	+
6	11/12	T25R	+
7	13/14	F26L	+
8	15/16	E27K	+
9	17/18	D30S	+
10	19/20	S33N	+
11	21/22	E34N	+
12	23/24	E34G	+
13	25/26	E34L	+
14	27/28	E34D	+
15	29/30	E34S	+
16	31/32	Y35W	++
17	33/34	Y35K	++
18	35/36	S37W	+
19	37/38	S37F	+
20	39/40	S37E	+
21	41/42	S37N	+
22	43/44	S37T	+
23	45/46	S37C	+
24	47/48	I39K	++
25	49/50	I39R	++
26	51/52	W40F	+
27	53/54	K41E	+
28	55/56	D54G	+
29	57/58	H55Q	+
30	59/60	S57L	+
31	61/62	I58T	+
32	63/64	I58Y	+
33	65/66	I58A	+
34	67/68	I58R	+
35	69/70	I58V	+
36	71/72	I58S	+
37	73/74	I58C	+
38	75/76	K86P	+
39	77/78	T91A	+
40	79/80	F95Y	+

10

20

30

41	81/82	C97Y	+
42	83/84	I98V	+
43	85/86	K106V	+
44	87/88	K106T	+
45	89/90	K106Q	+
46	91/92	F111S	+
47	93/94	K112E	+
48	95/96	I118F	+
50	97/98	H119R	++
51	99/100	H119F	+
52	101/102	I120V	+
53	103/104	K123D	++
54	105/106	K123N	+
55	107/108	K123Q	+
56	109/110	K123S	+
57	111/112	K123I	+
58	113/114	K123T	+
59	115/116	T130N	+
60	117/118	D134G	+
61	119/120	V135K	+
62	121/122	N165H	+
63	123/124	K209R	+
64	125/126	I223V	+

10

20

【 0 0 5 1 】

表 1 に S E Q I D N O : 2 に基づく配列に異なる部位のアミノ酸変化を行うことによる、突然変異したプロリン水酸化酵素触媒活性についての影響を示す。ここで、突然変異したプロリン水酸化酵素は *E. coli* B L 2 1 細胞から発現され、触媒活性は該酵素による L-ピペリジン酸に対する変換効率に基づくものである。触媒反応は 1 0 m L の反応体系で行われ、該反応体系は L-ピペリジン酸 3 0 g / L、5 ~ 1 0 w t の組換え酵素 (1 w t は、1 g の主原料の変換に 1 g のプロリン水酸化酵素変異体組換えウェット細胞が必要であることを指す。)、3 7 . 3 g / L -ケトグルタル酸、6 . 1 g / L の L-アスコルビン酸、5 m M 硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応 p H 6 . 5、反応温度 1 0

30

【 0 0 5 2 】

【表 2】

表 2 プロリン水酸化酵素の多点突然変異の活性の比較

番号	SEQ ID NO: (DNA/AA)	突然変異アミノ酸	活性
1	127/128	E27K+K123D	++
2	129/130	E27K+I39K	+++
3	131/132	I39K+K123Q	++
4	133/134	I39K+K123D	++
5	135/136	S37C+I223V+K123D	++
6	137/138	K123D+N165H	++
7	139/140	I39R+K123D	+++
8	141/142	E27K+I39K+K123D	+++
9	143/144	E27K+I39R	+++
10	145/146	I39R+N165H	+
11	147/148	I39K+N165H	+
12	149/150	E27K+I39R+K123D	+++
13	151/152	S37C+I223V+N165H	+
14	153/154	K123D+W40F	++
15	155/156	E27K+N165H	++
16	157/158	E27K+S37C+I223V+K123D	+++
17	159/160	S37C+I39K+I223V+K123D	++++
18	161/162	E27K+S37C+I39K+K123D+I98V	++++
19	163/164	E27K+S37C+I39K+K123D+I223V	++
20	165/166	F26L+E27K+I39K+K123D	++
21	167/168	I223V+S37C+E27K+I39K	+++
22	169/170	I223V+S37C+E27K+N165H	+++
23	171/172	K123D+Y35W	++
24	173/174	K123D+Y35W+I120V	++
25	175/176	E27K+Y35W	++
26	177/178	I39R+Y35W	++++
27	179/180	S37C+I223V	++
28	181/182	E27K+I39K+Y35W	++++
29	183/184	E27K+S37C+I39K+I98V+K123D+I223V	++
30	185/186	E27K+I39K+K123D+N165H	+
31	187/188	E27K+I39R+Y35W	+++
32	189/190	S37C+I39K+N165H	++
33	191/192	E27K+I39K+D30S	+++
34	193/194	E27K+I39K+E34N	+++
35	195/196	E27K+I39K+E34G	+++
36	197/198	E27K+I39K+S37W	+++
37	199/200	E27K+I39K+S37E	+++
38	201/202	E27K+I39K+Y35K	+++
39	203/204	E27K+I39K+S37N	+++

10

20

30

40	205/206	E27K+I39K+K123Q	+++
41	207/208	E27K+I39K+K123S	+++
42	209/210	E27K+I39K+K106Q+K112E	+++
43	211/212	I98V+E27K+I39K	+++
44	213/214	E27K+I39K+I118F	+++
45	215/216	E27K+I39K+S37T	+++
46	217/218	E27K+I39K+K123I	+++
47	219/220	K106Q+K112E+I223V	+++
48	221/222	H14R+E34G+K106Q+K112E+I223V	+++
49	223/224	E27K+I39K+E34L	+++
50	225/226	E27K+I39K+S37F+I58T	+++
51	227/228	E27K+I39K+S37F+I58Y	+++
52	229/230	E27K+I39K+S37F+I58A	+++
53	231/232	E27K+I39K+S37F+I58R	+++
54	233/234	E27K+I39K+S37F+I58V	+++
55	235/236	E27K+I39K+S37F+I58S	+++
56	237/238	E27K+I39K+S37N+I58C	+++
57	239/240	E27K+D30S+I39K+I58R+K112E	++++
58	241/242	E27K+E34N+I39K+I58Y+I223V	++++
59	243/244	E27K+S37N+I39K+I58Y+D173G	+++
60	245/246	E27K+S37F+I39K+I58Y+D173G	+++
61	247/248	E27K+I39K+S37N+I58A	+++
62	249/250	E27K+I39K+S37N+I58R+K123Q	+++
63	251/252	E27K+S37F+I39K+I58Y+D173G+I118R	+++
64	253/254	E27K+E34L+S37N+I39K+I58R	+++
65	255/256	E27K+E34L+S37N+I39K+I58Y+D173G	+++
66	257/258	E27K+E34L+S37N+I39K+I58Y+D173G+K123Q	+++
67	259/260	H14R+E27K+D30S+E34G+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
68	261/262	H14R+E27K+E34N+I39K+I98V+K106Q+K112E+I223 V	+++
69	263/264	H14R+E27K+E34G+I39K+I98V+K106Q+K112E+I223 V	+++
70	265/266	H14R+E27K+E34G+S37W+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
71	267/268	H14R+E27K+E34G+S37F+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
72	269/270	H14R+E27K+E34G+S37E+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
73	271/272	H14R+E27K+E34G+Y35K+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	++++

10

20

30

74	273/274	H14R+E27K+E34G+S37N+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
75	275/276	H14R+E27K+E34G+I39K+I98V+K106Q+K112E+K123 Q+I223V	++++
76	277/278	H14R+E27K+E34G+I39K+I98V+K106Q+K112E+K123 S+I223V	+++
77	279/280	H14R+E27K+E34G+I39K+I58A+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
78	281/282	H14R+E27K+E34G+I39K+I98V+K106Q+K112E+I118 F+I223V	+++
79	283/284	H14R+E27K+E34G+S37T+I39K+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
80	285/286	H14R+E27K+E34G+I39K+I58V+I98V+K106Q+K112E +I223V	+++
81	287/288	H14R+E27K+E34G+I39K+I98V+K106Q+K112E+K123 I+I223V	+++

10

【 0 0 5 3 】

表 2 は、複数の部位のアミノ酸の変化によるプロリン水酸化酵素触媒活性に対する影響を示す。該プロリン水酸化酵素は E. coli BL 2 1 細胞から発現され、触媒活性は該酵素による L-ピペリジン酸に対する変換効率に基づくものである。該触媒過程は 2 0 m L の反応体系で行われ、その中に L-ピペリジン酸 5 0 g / L、2 ~ 5 w t の組換え酵素、6 2 . 2 g / L -ケトグルタル酸、1 0 . 2 g / L の L-アスコルビン酸、5 m M 硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応 p H 6 . 5、反応温度 1 0 、反応時間 4 0 h である。

20

【 0 0 5 4 】

一部の実施形態において、プロリン水酸化酵素活性に関連する一つまたは複数のアミノ酸残基を核心として選別して不変に保持し、他のアミノ酸残基位置には新しい突然変異を導入すると、改善された性質を有するプロリン水酸化酵素を得ることができる。よって、上記好適な実施例におけるいずれか一つのプロリン水酸化酵素をいずれも、遺伝子工学手段で他のプロリン水酸化酵素突然変異体を合成する母体アミノ酸配列とすることができる。例えば、幾つかの進化を経て得たアミノ酸残基は、表 1 と表 2 に示すアミノ酸配列と相違点のある新規の突然変異体である。

30

【 0 0 5 5 】

上述したいずれか一つのプロリン水酸化酵素または上述したアミノ酸水酸化酵素及びその変異体を基礎に他のアミノ酸残基位置で一つまたは複数のアミノ酸残基の突然変異を行って得られる新規のプロリン水酸化酵素活性を有する突然変異体はいずれも本発明の保護範囲に含まれる。ここで例として、E 2 7 アミノ酸残基突然変異を含むプロリン水酸化酵素突然変異体は、さらに一つまたは複数の他のアミノ酸、例えば H 1 4、S 1 6、T 2 5、F 2 6、D 3 0、S 3 3、E 3 4、Y 3 5、S 3 7、I 3 9、W 4 0、K 4 1、D 5 4、H 5 5、S 5 7、I 5 8、K 8 6、T 9 1、F 9 5、C 9 7、I 9 8、K 1 0 6、F 1 1 1、K 1 1 2、K 1 6 2、L 1 6 6、I 1 1 8、H 1 1 9、I 1 2 0、K 1 2 3、T 1 3 0、D 1 3 4、V 1 3 5、S 1 5 4、N 1 6 5、D 1 7 3、K 2 0 9、I 2 2 3、S 2 2 5 の突然変異をさらに行うことができるが、これに限定されることはない。他の例として、I 3 9 アミノ酸残基突然変異を含むプロリン水酸化酵素突然変異体は、一つまたは複数の他のアミノ酸、例えば H 1 4、S 1 6、T 2 5、F 2 6、E 2 7、D 3 0、S 3 3、E 3 4、Y 3 5、S 3 7、W 4 0、K 4 1、D 5 4、H 5 5、S 5 7、I 5 8、K 8 6、T 9 1、F 9 5、C 9 7、I 9 8、K 1 0 6、F 1 1 1、K 1 1 2、K 1 6 2、L 1 6 6、I 1 1 8、H 1 1 9、I 1 2 0、K 1 2 3、T 1 3 0、D 1 3 4、V 1 3 5、S 1 5 4、N 1 6 5、D 1 7 3、K 2 0 9、I 2 2 3、S 2 2 5 の突然変異をさらに行うことができる。さらに、例として、I 5 8 アミノ酸残基突然変異を含むプロリン水酸化酵素突然変異体は、一つまたは複数の他のアミノ酸、例えば H 1 4、S 1 6、T 2 5、F 2 6、E 2

40

50

7、D30、S33、E34、Y35、S37、I39、W40、K41、D54、H55、S57、I58、K86、T91、F95、C97、I98、K106、F111、K112、K162、L166、I118、H119、I120、K123、T130、D134、V135、S154、N165、D173、K209、I223、S225の突然変異をさらに行うことができる。

【0056】

上記水酸化酵素はプロリン水酸化酵素活性を有し、同時に、(2S)-ピペリジン-2-カルボキシル酸の(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸への変換を触媒し、遺伝子工学方法で酵素の触媒活性を改善でき、一部の実施形態において突然変異体の水酸化酵素活性はSEQ ID NO: 2自体でコーディングした水酸化酵素の活性より1倍、2倍、3倍、4倍、5倍またはさらに向上される。

10

【0057】

本発明の他の典型的な実施形態においてDNA分子をさらに提供し、該DNA分子は上述したいずれかの水酸化酵素のコーディングを行う。コーディングした上記水酸化酵素は特異度が高く、触媒活性が顕著に向上されたメリットを有する。

【0058】

本発明のさらなる他の典型的な実施形態において、組換えプラスミドをさらに提供し、該組換えプラスミドには上記DNA分子が接続される。該DNA分子は上述したいずれかの選択性が高く及び/または触媒活性が顕著に向上されたプロリン水酸化酵素のコーディングを行う。具体的な配列は、表1と表2における番号が奇数である配列またはこれらの配列の上記アミノ酸部位の変化を保つ前提で、他の部位のアミノ酸配列に置換、追加または欠失突然変異が発生したヌクレオチド配列から選ばれる。

20

【0059】

上記組換えプラスミドにおいて、上記水酸化酵素のDNA分子を表現できる組換えプラスミドはすべて本発明に適用できる。本発明の好適な実施例において、組換えプラスミドは、pET-22b(+), pET-21b(+), pET-3a(+), pET-3d(+), pET-11a(+), pET-12a(+), pET-14b(+), pET-15b(+), pET-16b(+), pET-17b(+), pET-19b(+), pET-20b(+), pET-21a(+), pET-23a(+), pET-23b(+), pET-24a(+), pET-25b(+), pET-26b(+), pET-27b(+), pET-28a(+), pET-29a(+), pET-30a(+), pET-31b(+), pET-32a(+), pET-35b(+), pET-38b(+), pET-39b(+), pET-40b(+), pET-41a(+), pET-41b(+), pET-42a(+), pET-43a(+), pET-43b(+), pET-44a(+), pET-49b(+), pQE2, pQE9, pQE30, pQE31, pQE32, pQE40, pQE70, pQE80, pRSET-A, pRSET-B, pRSET-C, pGEX-5X-1, pGEX-6p-1, pGEX-6p-2, pBV220, pBV221, pBV222, pTrc99A, pTwin1, pEZZ18, pKK232-18, pUC-18, pUC-19から選ばれる一つである。

30

【0060】

本発明の他の典型的な実施形態において、宿主細胞をさらに提供し、該宿主細胞は上述したいずれかの組換えプラスミドを含む。具体的な宿主細胞は、原核細胞または真核細胞であることができ、ここで真核細胞が酵母細胞であることが好ましい。上記宿主細胞が受容性細胞であることがさらに好ましく、受容性細胞が大腸菌BL21細胞または大腸菌W3110であることが最も好ましい。

40

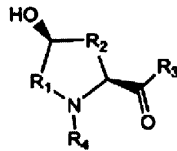
【0061】

本発明の他の典型的な実施形態において、L-ヒドロキシプロリン誘導体を生産する方法をさらに提供し、該方法は、L-プロリン誘導体を基質として、上述したいずれかの水酸化酵素で基質のヒドロキシ化を触媒して、一般式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることを含む。

【0062】

50

【化1】



.....式(I)

【0063】

ここで、 R_1 は($C_1 \sim C_5$)のアルキリデン基または($C_2 \sim C_5$)のアルケニレン基から選ばれ、 R_2 は($C_0 \sim C_4$)のアルキリデン基または($C_2 \sim C_4$)のアルケニレン基から選ばれ、 R_3 はヒドロキシ、アミノ、($C_1 \sim C_6$)のアルコキシ基、アリアルオキシ基、($C_1 \sim C_6$)のアルキルチオ基、アリアルチオ基から選ばれ、 R_4 は水素、($C_1 \sim C_6$)のアルキル基、($C_2 \sim C_6$)のアルケニル基、($C_2 \sim C_6$)のアルキニル基から選ばれる。

10

【0064】

本発明の上記プロリン水酸化酵素を利用して、L-プロリン誘導体をヒドロキシ化物に触媒すると、触媒効率を向上させるとともに、L-プロリン誘導体の変換率を向上させ、さらに触媒の特異度を向上させて、得られるL-ヒドロキシプロリン誘導体の目標産物の純度が向上され、後続の分離ステップを減少できる。

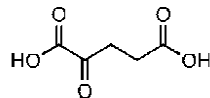
【0065】

上記プロリン水酸化酵素で触媒してL-ヒドロキシプロリン誘導体を合成する化学反応方程式は図2に示すとおりである。ここで、

20

【0066】

【化2】

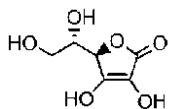


は α -ケトグルタル酸で、プロリン水酸化酵素の触媒反応において、 α -ケトグルタル酸と O_2 を共同の基質とする。鉄イオンを補助因子とした共同作用で、基質のヒドロキシ化を触媒して、L-ヒドロキシプロリン誘導体を得る。

30

【0067】

【化3】



はビタミンCで、アスコルビン酸とも呼ばれ、プロリン水酸化酵素の触媒反応において、主に鉄イオンを循環させる作用を果たす。

【0068】

上記プロリン水酸化酵素は、典型的なジオキシゲナーゼで、触媒反応は既存のプロリン水酸化酵素と同様で、いずれも α -ケトグルタル酸と O_2 の存在を必要とし、且つ鉄イオンを補助因子とする必要がある。したがって、上記方法は、 α -ケトグルタル酸と O_2 を共同の基質とし、鉄イオンを補助因子として、プロリン水酸化酵素の触媒で、基質のヒドロキシ化を触媒して、L-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることを含む。

40

【0069】

具体的な反応条件は、既存のプロリン水酸化酵素反応体系を基に適切な調整を経て得られる。例えば、還元剤(例えばアスコルビン酸)の濃度、洗剤濃度、pH、温度、緩衝液、溶剤システム、ベースの投入、ポリペプチドの添加、圧力と反応時間等を適切に調整できる。一部の実施形態において、具体的な反応条件は下記のとおりである：基質15~120g/L、1.5g~48g/Lの水酸化酵素、1~2.5eq(eq：使用される物料の

50

質量と主原料の質量との比例を指す。) -ケトグルタル酸、0.1~0.3 eq L-アスコルビン酸、1 mM~10 mM硫酸第一鉄アンモニウム、反応pH 6~8、反応温度5~30、反応時間6~96 h。一部の実施形態において、適切な反応条件は反応液に2~5 L/hの酸素と0.5~2%の消泡剤を通過させることを含む。

【0070】

本発明の好適な実施例において、上記プロリン水酸化酵素は、5~45の反応温度で、基質のヒドロキシ化を触媒して、一般式(I)に示すL-ヒドロキシプロリン誘導体を得ることができる。5~15の反応温度で上記触媒反応を行うことがさらに好ましい。本発明で提供するプロリン水酸化酵素は、低い温度で基質をヒドロキシ化物に触媒するだけでなく、さらに触媒特異度(即ち選択性)を向上させ、産物の純度を向上させることができる。

10

【0071】

上記酵素は、複種類のL-プロリン誘導体のヒドロキシ化を触媒できる。本発明の好適な実施例において、L-プロリンまたはL-ピペリジン酸にヒドロキシ化を行って、シス-4-ヒドロキシ-L-プロリンまたは(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を得る。上記2種類の基質にはヒドロキシ化を行う特異度が最も高く、基質の100%をシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンまたは(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸に変換させることができる。

【0072】

以下、具体的な実施例を結合して本発明の有益な効果を説明する。以下の実験方法は、特別な説明がない限り、いずれも通常の方法であって、使用される実験材料は特別な説明がない限りいずれも商業会社から簡単に入手できるものである。

20

【0073】

実施例1：プロリン水酸化酵素の組換え発現

Kordia jejudonensisからの仮説タンパク質と注釈されたDNAコーディング配列SEQ ID NO:1にコドン最適化(大腸菌コドン嗜好性(Codon bias)及び縮退性(Codon degeneracy)に応じてコドン改善を行い、蘇州金唯智生物科学技術有限公司によりデザインした。)を行って、最適化後のDNA配列SEQ ID NO:3を得て、コーディングしたプロリン水酸化酵素のポリペプチド配列はSEQ ID NO:4である。SEQ ID NO:3のコーディング配列をpET22b(+)発現ベクター(Novagenから購入、製品番号69744)に接続し、その後、大腸菌BL21(DE3)に変換させ、50 µg/mlアンピシリンを含むLB培養皿に塗布し、37で一晚培養した。上記培養皿上のモノクローンを選別して試験管で活性化した後、50 µg/mlアンピシリンを含有する500 mlのLB液体培地に接種し、37でOD₆₀₀ = 0.6になるまで振動培養し、濃度が1 mMまでIPTGを添加し、25で誘導発現を行った。16 h誘導した後、6000 g遠心10 minして菌体を収集する。菌体を超音波ブレイカ(JY92-2D、寧波新芝生物科学技術株式会社)で細胞を粉碎し、4、10000 gで20 min遠心して上澄み液を得て、野生型プロリン水酸化酵素活性の検出に利用し、突然変異体の活性を選別する対照とした。

30

【0074】

実施例2：プロリン水酸化酵素変異体の調製

SEQ ID NO:3配列を含むpET22b(+)発現ベクターをテンプレートとして、突然変異部位付きのプライマーで、全プラスミドのPCRによって完璧な線形セグメントを得て、上記PCR産物をDpnI消化によって母体テンプレートを除去し、その後、大腸菌BL21(DE3)に変換させ、50 µg/mlアンピシリンを含有するLB培養皿に塗布し、37で一晚培養した。プロリン水酸化酵素変異体アミノ酸配列を含むモノクローンを得て、さらに誘導試験と遺伝子順番測定を介して、突然変異部位を確定した。最終的に単一突然変異部位を有する突然変異体を得て、その後、単一突然変異部位の突然変異を突然変異母体として、さらに他の部位での突然変異のあるプライマーで全プラスミドのPCRを再度行って、突然変異部位を再び確定する。

40

50

【0075】

突然変異体の細菌を活性化した後、50 µg/mlのアンピシリンを含有する500 mlのLB液体培地に接種し、37 °CでOD₆₀₀ = 0.6になるまで振動培養し、IPTGを濃度が1 mMになるまで添加し、25 °Cで誘導発現を行った。16 h誘導した後、6000 gで10 min遠心して菌体を収集した。菌体を超音波ブレーカ(JY92-2D、寧波新芝生物科学技術株式会社)で細胞を粉碎し、4 °C、10000 gで20 min遠心して上澄み液を取得し、プロリン水酸化酵素変異体活性の検出に利用した。

【0076】

実施例3：プロリン水酸化酵素変異体の活性選別

SEQ ID NO：2に比べ一つのアミノ酸残基の差異のあるプロリン水酸化酵素変異体の活性選別に以下のような10 mLの反応液を利用して選別した。10 mLの反応液は、L-ピペリジン酸30 g/L、5~10 wt(1 wtは、1 gの主原料の変換に1 gのプロリン水酸化酵素変異体組換えウェット細胞が必要であることを指す。)の組換え粗酵素、37.3 g/L L-ケトグルタル酸、6.1 g/LのL-アスコルビン酸、5 mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10 °Cで、反応時間が40 hである。反応が終了した後、200 µLの反応体系を取り、200 µLのアセトニトリルを添加して、均一に混合して、3000 µL精製水を添加し、10000 rpmで5 min遠心して上澄み液を収集してHPLCによる変換率の検出に利用し、活性選別結果は、表1に示す(表1は、すべての変換率データを比較して得た活性選別結果である)。

【0077】

SEQ ID NO：2に比べ複数のアミノ酸残基の差異のあるプロリン水酸化酵素変異体の活性選別に以下のような20 mLの反応液を利用して選別した。20 mLの反応液に、L-ピペリジン酸50 g/L、2~5 wtの組換え酵素、62.2 g/L L-ケトグルタル酸、10.2 g/LのL-アスコルビン酸、5 mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10 °Cで、反応時間が40 hである。反応が終了した後、100 µLの反応体系を取り、200 µLのアセトニトリルを添加して、均一に混合して、3000 µL精製水を添加し、10000 rpmで5 min遠心して上澄み液を収集してHPLCによる変換率の検出に利用し、活性選別結果は表2に示す(表2は、すべての変換率データを比較して得た活性選別結果である)。

【0078】

実施例4：プロリン水酸化酵素突然変異体のクローンと発現

水酸化酵素突然変異体の発現及び鑑定の便宜を図るため、その遺伝子の5'と3'末端に互換性のある制限酵素切断部位を設置した。Nde IとXho Iでそれぞれ、目標遺伝子とpET-22b(+)(他の大腸菌でタンパク質を発現できる発現プラスミドも使用可能である)に同時に酵素切断を行うことができ、酵素切断後の目標遺伝子とプラスミドの大きいフラグメントについてはT4 DNA接続酵素で接続反応を行わせ、接続産物を大腸菌DH5α菌株の受容性細胞に変換し、その後、変換後の受容性細胞を50 µg/mlのアンピシリンを含有するLB培養板に塗布し、37 °Cで一晩培養した。

【0079】

上記培養皿に成長された単一のコロニーを選んで50 µg/mlのアンピシリンを含有するLB液体培地に接種し、37 °Cで一晩振動培養し、菌体を収集してプラスミド抽出を行い、PCR鑑定と二重酵素切断鑑定後、正確なクローンベクターをpET22b(+)-R-Mと命名して、大腸菌BL21(DE3)に変換させ、変換された大腸菌BL21(DE3)を50 µg/mlのアンピシリンを含有するLB培養板に塗布し、37 °Cで一晩培養した。上記培養板に成長された単一のコロニーを選んで50 µg/mlのアンピシリンを含有する5 mlのLB液体培地に接種し、コロニーPCRで鑑定し、正確な発現ベクターを含む大腸菌に後続の誘導発現を行った。上記菌液を50 µg/mlのアンピシリンを含有する500 mlのLB液体培地に接種し、37 °CでOD₆₀₀ = 0.5~0.6になるまで振動培養して、IPTGを最終濃度がそれぞれ0.2~1.0 mMになるまで添加し、18~25 °Cで10~16 h誘導発現した後、菌液を取って、6000 gで10 min遠心し

10

20

30

40

50

て菌体を収集して、-20℃に冷凍しておいた。菌体を超音波ブレイカ(JY92-2D、寧波新芝生物科学技術株式会社)で細胞を粉碎し、4℃、10000gで20min遠心して上澄み液と堆積物を得て、上澄み液を垂直型電気泳動装置でSDS-PAGE検出を行った。発現された水酸化酵素突然変異体はSDS-PAGEで現す分子量は約30KDであった。

【0080】

実施例5：表1と表2における水酸化酵素と野生型プロリン水酸化酵素の性能比較

図1に示す、水酸化酵素で触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸(シス-5-ヒドロキシピペリジン酸とも呼ばれる)を合成する化学反応過程に従って以下の実験を行う。

【0081】

SEQ ID NO:2でコーディングされた野生型プロリン水酸化酵素でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、10wtの水酸化酵素、62.2g/L-ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10℃で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。40hの際、変換率は98.47%で、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.36%であった。

【0082】

SEQ ID NO:16でコーディングされたE27Kアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、10wt/8wtの組換え酵素、62.2g/L-ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10℃で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ10wtと8wtである反応体系において、40hの際、変換率はそれぞれ100%、94.53%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.32%であった。

【0083】

SEQ ID NO:122でコーディングされたN165Hアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、10wtと6.67wtの組換え酵素、62.2g/L-ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10℃で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ10wtと6.67wtである反応体系において、40hの際、変換率はそれぞれ100%、90.41%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は99.89%であった。

【0084】

さらなる好適な単点突然変異体として、SEQ ID NO:104でコーディングされたK123Dアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリ

10

20

30

40

50

ジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、8wt/5wt/4wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収取して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ8wt、5wt、4wtである反応体系において、40hの場合、変換率はそれぞれ100%、97.83%、89.09%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.68%であった。

10

【0085】

多点突然変異体として、SEQ ID NO:180でコーディングされたS37C+I223Vアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、8wt/5wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収取して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ8wt、5wtである反応体系において、40hの際、変換率はそれぞれ100%、93.99%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.25%であった。

20

【0086】

多点突然変異体として、SEQ ID NO:178でコーディングされたI39R+Y35Wアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、5wt/3wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収取して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ5wt、3wtである反応体系において、40hの際、変換率はそれぞれ100%、94.45%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は75.02%であった。該突然変異体の選択性がやや低い、その触媒活性は野生型プロリン水酸化酵素より明確に向上された。

30

【0087】

さらに好適な組み合わせ突然変異体として、SEQ ID NO:140でコーディングされたI39R+K123Dアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、4wt/3wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収取して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ4wt、3wtである反

40

50

応体系において、40 hの際、変換率はそれぞれ97.35%、92.08%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は99.26%であった。

【0088】

さらなる好適な組み合わせ突然変異体として、SEQ ID NO:160でコーディングされたS37C+I39K+I223V+K123Dアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに以下の20 mLの反応液を使用した。20 mLの反応液は、L-ピペリジン酸50 g/L、3 wt/2 wtの組換え酵素、62.2 g/L-ケトグルタル酸、10.2 g/LのL-アスコルビン酸、5 mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10 で、反応時間が40 hである。反応が終了した後、100 μLの反応体系を取り、200 μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000 μL精製水を添加し、10000 rpmで5 min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ3 wt、2 wtである反応体系において、40 hの際、変換率はそれぞれ95.23%、88.41%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は99.90%であった。

10

【0089】

実施例6:

発明者が自己設計して構成したアミノ酸配列PH1(配列表中のSEQ ID NO:289を参照)は、SEQ ID NO:2と78%の相同性を有し、該タンパク質はL-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに使用される。以下の20 mLの反応液を使用する。20 mLの反応液は、L-ピペリジン酸50 g/L、9 wtの組換え酵素、62.2 g/L-ケトグルタル酸、10.2 g/LのL-アスコルビン酸、5 mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10 で、反応時間が40 hである。反応が終了した後、100 μLの反応体系を取り、200 μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000 μL精製水を添加し、10000 rpmで5 min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。40 hの際、変換率は98.56%で、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.45%であった。

20

30

【0090】

実施例7:

1)SEQ ID NO:2アミノ酸配列においてI39K+S33Nアミノ酸残基が突然変異した後、SEQ ID NO:2と99%の相同性を有し、そのアミノ酸配列は配列表中の290号を参照できる。該配列でコーディングした突然変異酵素は、L-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに使用される。以下の20 mLの反応液を使用する。20 mLの反応液は、L-ピペリジン酸50 g/L、8 wt/6 wtの組換え酵素、62.2 g/L-ケトグルタル酸、10.2 g/LのL-アスコルビン酸、5 mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10 で、反応時間が40 hである。反応が終了した後、100 μLの反応体系を取り、200 μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000 μL精製水を添加し、10000 rpmで5 min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。組換え酵素使用量がそれぞれ8 wt、6 wtである反応体系において、40 hの際、変換率はそれぞれ100%、91.62%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.89%であった。

40

【0091】

2)SEQ ID NO:2アミノ酸配列においてE27K+I39K+F28L+S31Aアミノ酸残基が突然変異した後、SEQ ID NO:2と98.6%の相同性を有し

50

、そのアミノ酸配列は配列表中のSEQ ID NO:291号を参照できる。該配列でコーディングした突然変異酵素は、L-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに使用される。以下の20mLの反応液を使用する。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、5wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。40hの際、変換率は98.75%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.30%であった。

10

【0092】

3)実施例6にて構成されたSEQ ID NO:2との相同性が78%であるSEQ ID NO:289配列を基礎として突然変異し、該配列のE27Kアミノ酸残基を突然変異させた後、配列表中のSEQ ID NO:292に示すアミノ酸配列を得て、SEQ ID NO:2と97.8%の相同性を有する。該配列でコーディングした突然変異プロリン水酸化酵素は、L-ピペリジン酸を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製するに使用される。以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-ピペリジン酸50g/L、7wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。40hの際、変換率は97.25%であって、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸のジアステレオマー過剰率は98.40%であった。

20

【0093】

比較例1:

既存技術において、*Sinorhizobium meliloti*菌からの組換えプロリン水酸化酵素で(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸を調製する過程において、(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸の最高ジアステレオマー過剰率は90.7%で、位置変異体である(2S,3R)-3-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸が9.3%発生した(WO2013169725A2)。

30

【0094】

実施例5に比べ、SEQ ID NO:2の水酸化酵素のジアステレオマー過剰率は98.36%であるに対し、比較例1のジアステレオマー過剰率は90.7%である。このように、本発明におけるSEQ ID NO:2の水酸化酵素の選択性が既存技術より優れている。

【0095】

実施例8:

表1と表2における水酸化酵素のシス-4-ヒドロキシ-L-プロリン調製中の応用、その反応過程を図2に示す。

40

【0096】

SEQ ID NO:104でコーディングされたK123Dアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体でL-プロリンを触媒してシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンを調製し、以下の20mLの反応液を使用して調製した。20mLの反応液は、L-プロリン50g/L、5wtの組換え酵素、62.2g/L -ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL

50

精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。40hの際、変換率は92.36%で、ジアステレオマー過剰率は99.30%であった。

【0097】

SEQ ID NO:160でコーディングされたS37C+I39K+I223V+K123Dアミノ酸残基が突然変異したプロリン水酸化酵素突然変異体であるL-プロリンでシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンを調製する際に以下の20mLの反応液を使用した。20mLの反応液は、L-プロリン50g/L、4wtの組換え酵素、62.2g/L-ケトグルタル酸、10.2g/LのL-アスコルビン酸、5mM硫酸第一鉄アンモニウムを含み、反応pHが6.5で、反応温度が10で、反応時間が40hである。反応が終了した後、100μLの反応体系を取り、200μLのアセトニトリルを添加し、均一に混合した後、3000μL精製水を添加し、10000rpmで5min遠心して上澄み液を収集して、HPLCによる変換率の検出に使用した。40hの際、変換率は99.47%で、ジアステレオマー過剰率は99.56%であった。

10

【0098】

このように、表1と表2における多くの突然変異体である水酸化酵素はシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンの調製にも応用でき、高純度と高選択性のシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンを得ることもできる。

【0099】

上述のように、本発明の上記実施例によると以下のような技術効果を生じ得る：SEQ ID NO:2を突然変異したプロリン水酸化酵素を選別する基礎配列とし、遺伝子工学手段によって、複数のプロリン水酸化酵素触媒活性及び選択性が顕著に向上された水酸化酵素を得ることができる。このような水酸化酵素は基質の変換率を高め、触媒専用位置異性体が少なく、特異性を有するプロリン誘導体のヒドロキシ化を触媒できる作用を実現させる。特に、L-ピペリジン酸のヒドロキシ化を触媒して(2S,5S)-5-ヒドロキシピペリジン-2-カルボキシル酸(シス-5-ヒドロキシピペリジン酸とも呼ばれる)を発生し、L-プロリンのヒドロキシ化によってシス-4-ヒドロキシ-L-プロリンを発生する。

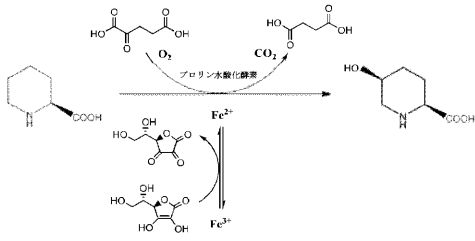
20

【0100】

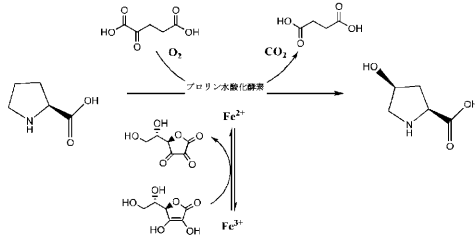
以上は、本発明の好適な実施例に過ぎず、本発明を限定するものではない。当業者であれば本発明に様々な修正や変形が可能である。本発明の精神や原則内での全ての修正、均等置換、改良などは本発明の保護範囲内に含まれる。

30

【図1】



【図2】



【配列表】

0006870102000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	9/02	(2006.01)	C 1 2 N	9/02	
C 1 2 P	13/24	(2006.01)	C 1 2 P	13/24	A

(73)特許権者 519153028

アシムケム ライフ サイエンス (ティエンジン) カンパニー リミテッド
 ASYMCHEM LIFE SCIENCE (TIANJIN) CO., LTD.
 中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン ティーイーディーイー, セブンス アベニュー,
 ナンバー 7 1

(73)特許権者 519153039

ティエンジン アシムケム ファーマシューティカルズ カンパニー リミテッド
 TIANJIN ASYMCHEM PHARMACEUTICALS CO., LTD.
 中華人民共和国, 3 0 0 4 6 2 ウェスト ティエンジン ティーイーディーイー, セブンス ア
 ベニュー シンイェ, ナンバー 7 1

(73)特許権者 519153040

アシムケム ラボラトリーズ (フーシン) カンパニー リミテッド
 ASYMCHEM LABORATORIES (FUXIN) CO., LTD.
 中華人民共和国, 1 2 3 0 0 0 リャオニン, フーシン, フーシン ハイテク インダストリアル
 ディベロップメント ゾーン, ディベロップメント アベニュー, ナンバー 9 0

(73)特許権者 519153051

ジーリン アシムケム ラボラトリーズ カンパニー リミテッド
 JILIN ASYMCHEM LABORATORIES CO., LTD.
 中華人民共和国, 1 3 3 7 0 0 ジーリン, ドゥンファ, エコノミック ディベロップメント ゾ
 ーン, ホンダー ロード, ナンバー 9 9

(74)代理人 110002066

特許業務法人筒井国際特許事務所

(72)発明者 ホン, ハオ

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

(72)発明者 ジェームズ, ゲージ

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

(72)発明者 ルー, ジエンピン

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

(72)発明者 ジャン, ナー

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

(72)発明者 ユー, ウェンヤン

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

(72)発明者 リウ, ファン

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

(72)発明者 リー, ヤンジュン

中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
 ナンバー 7 1

- (72)発明者 フアン, シン
中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
ナンバー 7 1
- (72)発明者 ガオ, ジュエン
中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
ナンバー 7 1
- (72)発明者 ジャン, クーージェン
中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
ナンバー 7 1
- (72)発明者 マー, ユーレイ
中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
ナンバー 7 1
- (72)発明者 ウェイ, ジュンルー
中華人民共和国, 3 0 0 4 5 7 ティエンジン, ティーイーディーイー セブンス ストリート,
ナンバー 7 1

審査官 濱田 光浩

- (56)参考文献 国際公開第 2 0 1 3 / 1 6 9 7 2 5 (W O , A 2)
中国特許出願公開第 1 0 5 7 1 3 8 8 3 (C N , A)
中国特許出願公開第 1 0 4 9 2 8 3 1 1 (C N , A)
hypothetical protein [Kordia jejudonesis], NCBI, 2 0 1 5 年 3 月 1 1 日, Locus: WP_046
758372, ACCESSION: WP_046758372, VERSION: WP_046758372.1, U R L , [https://www.ncbi.nlm
.gov/protein/820796838?sat=48&satkey=67583313](https://www.ncbi.nlm.gov/protein/820796838?sat=48&satkey=67583313)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)
G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q
U n i P r o t / G e n e S e q
S w i s s P r o t / G e n e S e q
W P I D S (S T N)