

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成28年11月17日(2016.11.17)

【公表番号】特表2016-515399(P2016-515399A)

【公表日】平成28年5月30日(2016.5.30)

【年通号数】公開・登録公報2016-033

【出願番号】特願2016-508291(P2016-508291)

【国際特許分類】

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 (2006.01)

C 1 2 P 7/02 (2006.01)

C 1 2 P 13/00 (2006.01)

C 1 2 P 41/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/02 (2006.01)

【F I】

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 N 15/00 Z N A

C 1 2 P 7/02

C 1 2 P 13/00

C 1 2 P 41/00 Z

C 1 2 N 9/02

【手続補正書】

【提出日】平成28年9月28日(2016.9.28)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

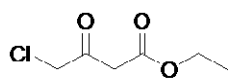
【補正方法】変更

【補正の内容】

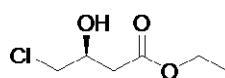
【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性を有する、前記デザイナー細胞。



式 1



式 2

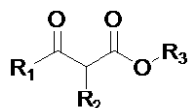
【請求項2】

配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレー

トから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり15倍から26倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。

【請求項3】

配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式3の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から275倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。

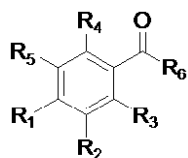


式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

【請求項4】

配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から180倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。

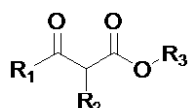


式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ であり、 $n = 1$ から5である。)

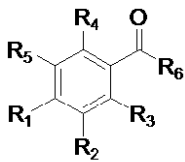
【請求項5】

配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり約3倍から15倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

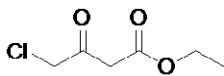


式 4

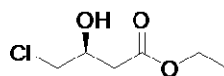
(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H, CH}_3, \text{F, Cl, Br, I, CF}_3, \text{NO}_2$ 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基であり、 $n = 1$ から 5 である。)

【請求項 6】

配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式1のエチル4-クロロ-3-オキシブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり200倍から250倍強化された活性を有する、前記デザイナー細胞。



式 1



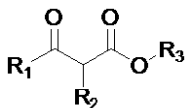
式 2

【請求項 7】

配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9、11、13又は15から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキシブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約11倍から24倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量当たり9倍から31倍強化された活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。

【請求項 8】

配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式3の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約55倍から270倍高い活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。



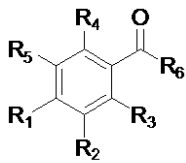
式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{X}, (\text{CH}_3)_2\text{CH}, \text{CF}_3$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

【請求項 9】

配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に

存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約40倍から156倍高い活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。

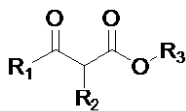


式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H, CH}_3, \text{F, Cl, Br, I, CF}_3, \text{NO}_2$ 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基であり、 $n = 1$ から5である。)

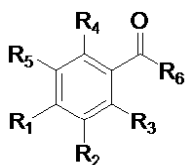
【請求項 10】

配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり約3倍から24倍高い活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3, \text{CH}_2\text{X}, (\text{CH}_3)_2\text{CH}, \text{CF}_3$ 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)



式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H, CH}_3, \text{F, Cl, Br, I, CF}_3, \text{NO}_2$ 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基であり、 $n = 1$ から5である。)

【請求項 11】

デザイナー細胞が、組換え大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)、又は組換え大腸菌C41(DE3)、又は組換え大腸菌C43(DE3)である、請求項1から10のいずれか1項に記載のデザイナー細胞。

【請求項 12】

カルボニルレダクターゼ活性を示す、配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

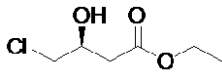
【請求項 13】

カルボニルレダクターゼ活性を示す配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及びGDH活性を示す配列番号:9又は11のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

【請求項 14】

下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレート約100%鏡像体過剰の製造の

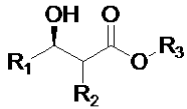
ための請求項1又は6に記載のデザイナー細胞の使用。



式 2

【請求項 1 5】

下記式5の化合物の製造のための請求項1又は6に記載のデザイナー細胞の使用。

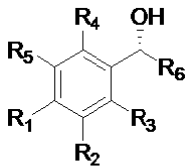


式 5

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

【請求項 1 6】

下記式6の化合物の製造のための請求項1又は6に記載のデザイナー細胞の使用。

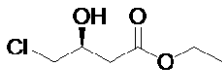


式 6

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ であり、 $n = 1$ から5である。)

【請求項 1 7】

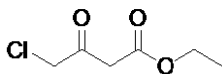
下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で製造する方法であって、



式 2

前記方法が、

a. 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、



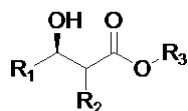
式 1

b. 該エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、請求項1～11のいずれか1項に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させる工程、

- c. 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒を10 : 1から1 : 1の範囲の比率で添加する工程、
 d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、
 e. 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて当該生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程を含む、前記方法。

【請求項 18】

光学的に濃縮された下記式5の脂肪族アルコールを製造する方法であって

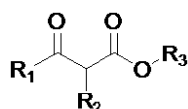


式 5

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)、

前記方法が、

- a. 下記式3のケトンを提供する工程、



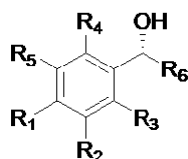
式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

- b. 工程 (a) で提供される式3のケトン、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸還元型 (NADPH) 及び100から500単位 of グルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、
 c. 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒を10 : 1から1 : 1の範囲の比率で添加する工程、
 d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、
 e. 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

【請求項 19】

光学的に濃縮された下記式6のアリールアルコールを製造する方法であって、

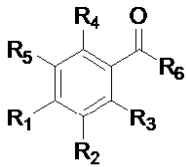


式 6

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ であり、 $n = 1$ から5である。)、

前記方法が、

- a. 下記式4のケトンを提供する工程、



式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H, CH_3, F, Cl, Br, I, CF_3, NO_2$ 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基であり、 $n = 1$ から 5 である。)

- b . 工程 (a) で提供される式 4 のケトン、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のデザイナー細胞並びに 0.005 から 0.02 モル % のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) 及び 100 から 500 単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及び pH5.0 から 9.0 の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、
- c . 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒を 10 : 1 から 1 : 1 の範囲の比率で添加する工程、
- d . 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に 20 から 40 の一定の温度で混合する工程、
- e . 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式 6 の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

【請求項 20】

アクセッション番号 MTCC No.5806、MTCC No.5807、MTCC No.5808、MTCC No.5809、MTCC No.5810、MTCC No.5811、MTCC No.5812、MTCC No.5813、MTCC No.5814、MTCC No.5815、MTCC No.5816 及び MTCC No.5817 のいずれかを有するデザイナー細胞。

【請求項 21】

配列番号 1 ~ 8 を含みかつ発現できる組換えベクター構築物であって、カルボニルレダクターゼ酵素の天然に存在しない配列を含みかつ細胞表面上で高活性のカルボニルレダクターゼを発現できることを特徴とする組換えベクター構築物。

【請求項 22】

酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコナーゼデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる組換えベクター。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0143

【補正方法】変更

【補正の内容】

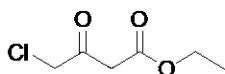
【0143】

生物触媒として形質転換大腸菌 BL21 (DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (CRS, 配列番号: 1; GDH, 配列番号: 9) 又は大腸菌 C41 (DE3)+pET Duet1-omp-CRS,omp-GDH (CRS, 配列番号: 1; GDH, 配列番号: 9) を用いるエチル (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの生成

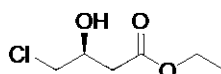
生成方法は、グルコースデヒドロゲナーゼが反応物に添加されなかったことを除き実施例 12 に記載した方法と同じであった。

本発明の好ましい態様は以下の通りである。

1. 配列リストの配列番号: 1、3、5 又は 7 から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号: 13 又は 15 又は 17 又は 19 の対応するカルボニルレダクターゼを下記式 1 のエチル 4-クロロ-3-オキシブチレートから下記式 2 のエチル (S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRS ポリペプチドの単位質量当たり 250 倍から 300 倍高い活性を有する、前記デザイナー細胞:



式 1



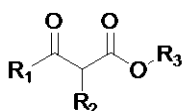
式 2

2. 配列リストの天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチド配列番号:1を細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約275倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

3. 配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり15倍から26倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

4. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり少なくとも15倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

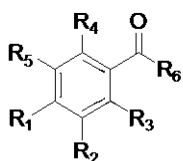
5. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式3の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から275倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

6. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から180倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

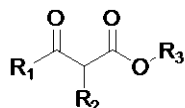


式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

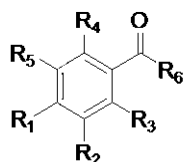
7. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを

細胞の表面で発現し、配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり約3倍から15倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。



式 3

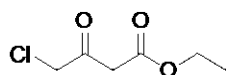
(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ であって；



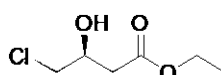
式 4

式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

8．配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり200倍から250倍強化された活性を有する、前記デザイナー細胞。



式 1



式 2

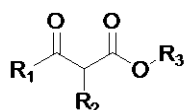
9．配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり約270倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり約225倍強化された活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。

10．配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9、11、13又は15から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約11倍から24倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量

当たり9倍から31倍強化された活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。

1 1 . 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキシブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約15倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量当たり約16倍強化された活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。

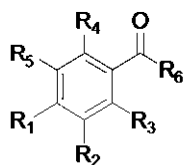
1 2 . 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式3の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約55倍から270倍高い活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

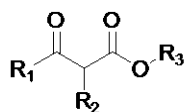
1 3 . 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約40倍から156倍高い活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。



式 4

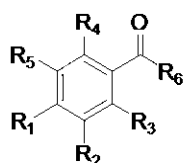
(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

1 4 . 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり約2倍から15倍高い活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)



式 4

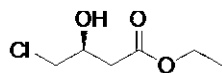
(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

15. デザイナー細胞が、組換え大腸菌 (*Escherichia coli*) BL21(DE3)、又は組換え大腸菌C41(DE3)、又は組換え大腸菌C43(DE3)である、上記1から14に記載のデザイナー細胞

16. カルボニルレダクターゼ活性を示す、配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

17. カルボニルレダクターゼ活性を示す配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及びGDH活性を示す配列番号:9又は11のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

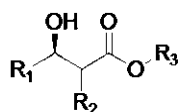
18. 下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約100%鏡像体過剰の製造のための上記1に記載のデザイナー細胞の使用。



式 2

19. 式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約100%鏡像体過剰の製造のための上記8に記載のデザイナー細胞の使用。

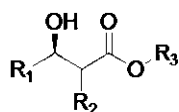
20. 下記式5の化合物の製造のための上記1に記載のデザイナー細胞の使用。



式 5

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

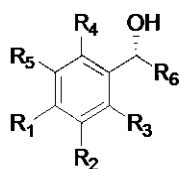
21. 下記式5の化合物の製造のための上記8に記載のデザイナー細胞の使用。



式 5

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

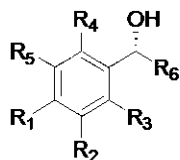
22. 下記式6の化合物の製造のための上記1に記載のデザイナー細胞の使用。



式 6

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

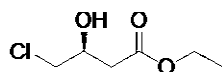
2 3 . 下記式6の化合物の製造のための上記8に記載のデザイナー細胞の使用。



式 6

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

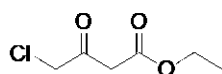
2 4 . 下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で製造する方法であって、



式 2

前記方法が、

f . 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、



式 1

g . 該エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、上記1に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸還元型 (NADPH) 及び100から500単位 of グルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させる工程、

h . 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒 (例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル) を10 : 1から1 : 1の範囲の比率で添加する工程、

i . 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

j . 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて当該生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程を含む、前記方法。

2 5 . pHが、好ましくは6.5である、上記24に記載の方法。

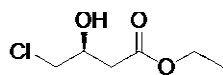
2 6 . 温度が、好ましくは30 である、上記24に記載の方法。

2 7 . 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記24に記載の方法。

2 8 . デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記24に記載の方法。

29. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記24に記載の方法

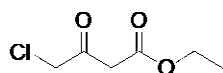
30. 下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレート^oを約100%鏡像体過剰で製造する方法であって、



式 2

前記方法が、

a. 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、



式 1

b. 該エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、上記8に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリソ酸還元型(NADPH)及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させる工程；

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程；

d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程；

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて当該生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程を含む、前記方法。

31. pHが、好ましくは6.5である、上記30に記載の方法。

32. 温度が、好ましくは30である、上記30に記載の方法。

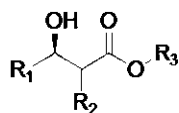
33. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記30に記載の方法。

34. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記30に記載の方法。

35. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)である、上記30に記載の方法。

36. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記30に記載の方法

37. 光学的に濃縮された下記式5の脂肪族アルコールを製造する方法であって

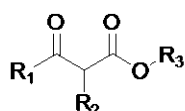


式 5

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)、

前記方法が、

f. 下記式3のケトンを提供する工程、



式 3

(式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

g. 工程(a)で提供される式3のケトン、上記1に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

h. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

i. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程、

j. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

38. pHが、好ましくは6.5である、上記37に記載の方法。

39. 温度が、好ましくは30である、上記37に記載の方法。

40. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記37に記載の方法。

41. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記37に記載の方法。

42. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記37に記載の方法

°

43. 光学的に濃縮された下記式6のアリールアルコールを製造する方法であって、

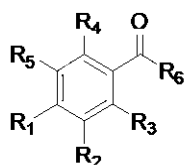


式 6

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)、

前記方法が、

f. 下記式4のケトンを提供する工程、



式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

g. 工程(a)で提供される式3のケトン、上記1に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応

混合物を形成する工程、

h. 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒 (例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル) を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

i. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

j. 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式6の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

44. pHが、好ましくは6.5である、上記43に記載の方法。

45. 温度が、好ましくは30 である、上記43に記載の方法。

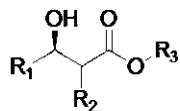
46. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記43に記載の方法。

47. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記43に記載の方法。

48. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記43に記載の方法。

。

49. 光学的に濃縮された下記式5の脂肪族アルコールを製造する方法であって、

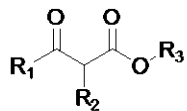


式 5

(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)、

前記方法が、

a. 下記式3のケトンを提供する工程、



式 3

(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

b. 工程 (a) で提供される式3のケトン、上記8に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸還元型 (NADPH) 及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

c. 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒 (例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル) を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

e. 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

50. pHが、好ましくは6.5である、上記49に記載の方法。

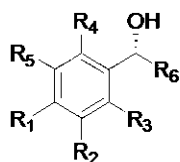
51. 温度が、好ましくは30 である、上記49に記載の方法。

52. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記49に記載の方法。

53. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記49に記載の方法。

54. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記49に記載の方法。

55. 光学的に濃縮された下記式6のアリールアルコールを製造する方法であって、

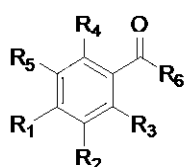


式 6

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である)、

前記方法が、

a. 下記式4のケトンを提供する工程、



式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である)、

b. 工程(a)で提供される式3のケトンを上記8に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチル-n-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程、

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式6の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

56. pHが、好ましくは6.5である、上記55に記載の方法。

57. 温度が、好ましくは30である、上記55に記載の方法。

58. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記55に記載の方法。

59. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記55に記載の方法。

60. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記55に記載の方法

61. アクセッション番号MTCC No.5806、MTCC No.5807、MTCC No.5808及びMTCC No.5809を有するデザイナー細胞。

62. アクセッション番号MTCC5806 - 5809を有するデザイナー細胞が配列番号:1、3、5及び7を有するアミノ酸配列を発現する、上記61に記載のデザイナー細胞。

63. 配列番号:1、3、5及び7を有するアミノ酸配列が配列番号:2、4、6、8を有するヌクレオチド配列と一致する、上記61 - 62に記載のデザイナー細胞。

64. 配列番号:1 - 8が、天然に存在しないカルボニルレダクターゼ酵素配列である、上記61 - 63に記載のデザイナー細胞。

65. 細胞表面で高活性のカルボニルレダクターゼを発現することができる、上記61 - 64に記載のデザイナー細胞。

66. 配列番号:1 - 8を含みかつ該配列を発現することができる組換えベクター構築物。

67．天然に存在しないカルボニルレダクターゼ酵素配列を含む、上記66に記載の組換えベクター構築物。

68．細胞表面で高活性のカルボニルレダクターゼを発現することができる、上記66 - 67に記載の組換えベクター構築物。

69．アクセッション番号MTCC No.5810、MTCC No.5811、MTCC No.5812、MTCC No.5813、MTCC No.5814、MTCC No.5815、MTCC No.5816及びMTCC No.5817を有するデザイナー細胞。

70．デザイナー細胞が、MTCC No.5810のアクセッション番号を有し配列番号:1及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5811のアクセッション番号を有し配列番号:1及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5812のアクセッション番号を有し配列番号:3及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5813のアクセッション番号を有し配列番号:配列番号:3及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5814のアクセッション番号を有し配列番号:5及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5815のアクセッション番号を有し配列番号:5及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5816のアクセッション番号を有し配列番号:7及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5817のアクセッション番号を有し配列番号:7及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、上記69に記載のデザイナー細胞。

71．配列番号:1、3、5、7、9及び11を有するアミノ酸配列が、配列番号:2、4、6、8、10及び12を有するヌクレオチド配列と一致する、上記69 - 70に記載のデザイナー細胞。

72．酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコナーゼデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる、上記65 - 67に記載のデザイナー細胞。

73．上記71に記載の配列を含み、さらに前記を発現することができる組換えベクター。

74．酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコナーゼデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる、上記73に記載の組換えベクター。