

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5973131号
(P5973131)

(45) 発行日 平成28年8月23日 (2016. 8. 23)

(24) 登録日 平成28年7月22日 (2016. 7. 22)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)
 C 1 2 N 1/21 (2006. 01)
 C 1 2 N 9/02 (2006. 01)
 C 1 2 P 7/02 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 9/02
 C 1 2 P 7/02

請求項の数 18 (全 100 頁)

(21) 出願番号 特願2010-525057 (P2010-525057)
 (86) (22) 出願日 平成20年9月13日 (2008. 9. 13)
 (65) 公表番号 特表2010-538657 (P2010-538657A)
 (43) 公表日 平成22年12月16日 (2010. 12. 16)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/076333
 (87) 国際公開番号 W02009/036404
 (87) 国際公開日 平成21年3月19日 (2009. 3. 19)
 審査請求日 平成23年9月9日 (2011. 9. 9)
 審査番号 不服2015-2317 (P2015-2317/J1)
 審査請求日 平成27年2月6日 (2015. 2. 6)
 (31) 優先権主張番号 60/972, 058
 (32) 優先日 平成19年9月13日 (2007. 9. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502427921
 コデクシス、 インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
 63, レッドウッド シティ, ペノブ
 スコット ドライブ 200
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (72) 発明者 リヤン, ジャック
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 944
 02, サン マテオ, サウス フレモ
 ント ストリート 513

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アセトフェノンの還元のためのケトレダクターゼポリペプチド

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質を生成物である (S)-1-(2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル) エタノールに立体選択的に還元することができる、野生型 *Lactobacillus* ケトレダクターゼに由来する、ケトレダクターゼポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の 190 位のアミノ酸残基がプロリンに変更された参照配列と少なくとも 94% 同一であるアミノ酸配列を含み、そして、該アミノ酸配列は、X 190 に対応する残基にプロリンを有し、かつ、X 196 に対応する残基にロイシン、メチオニン、フェニルアラニンまたはイソロイシンを有し、該アミノ酸配列は、X 94 に対応する残基にアラニン、バリンまたはシステインを有し、該アミノ酸配列は、X 206 に対応する残基にメチオニンまたはチロシンを有するが、ただし、X 153 および X 199 に対応する残基は修飾されておらず、該ポリペプチドは、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質を生成物である (S)-1-(2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル) エタノールに、少なくとも 99% の立体異性体過剰率で立体選択的に還元することができ、そして、該ポリペプチドはさらに、配列番号 6 の配列を有するケトレダクターゼポリペプチドによって可能な率よりも少なくとも 450% 大きい率で該基質を該生成物に変換することが可能である、ケトレダクターゼポリペプチド。

【請求項 2】

前記ポリペプチドが、配列番号 10、14、18、22、24、28、32、36、38

、40、42、44、46、56、58、60、62、64、68、70、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項3】

2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質を生成物である(S)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エタノールに立体選択的に還元することができる、野生型Lactobacillus ケトレダクターゼに由来する、ケトレダクターゼポリペプチドであって、該ポリペプチドは、配列番号20、48、50および52からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、ポリペプチド。

【請求項4】

次の特徴：

X7に対応する残基が、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、またはアスパラギンである；

X16に対応する残基が、セリンである；

X43に対応する残基が、イソロイシンである；

X95に対応する残基が、イソロイシンまたはロイシンである；

X96に対応する残基が、セリン、アスパラギン、トレオニンまたはグルタミン酸である；

X97に対応する残基が、リジン、トレオニン、バリン、アルギニン、メチオニン、またはイソロイシンである；

X120に対応する残基が、フェニルアラニンまたはバリンである；

X125に対応する残基が、グリシンまたはセリンである；

X147に対応する残基が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、またはグルタミンである；

X152に対応する残基が、セリン、トレオニン、またはメチオニンである；

X202に対応する残基が、アラニン、トリプトファン、チロシン、またはメチオニンである；および

X205に対応する残基が、アルギニンである、の1つ以上をさらに有するアミノ酸配列を含み；ならびに

前記アミノ酸配列が、前記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1つ以上の残基相違を有する、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項5】

前記ポリペプチドが、配列番号6の配列を有する前記ケトレダクターゼポリペプチドによって可能な率よりも少なくとも1500%大きい率で前記基質を前記生成物に変換することがさらに可能であり、かつ

該ポリペプチドが、配列番号18、32、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項1に記載のポリペプチド。

【請求項6】

請求項1～2および4～5のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドは、配列番号9、13、17、21、23、27、31、35、37、39、41、43、45、55、57、59、61、63、67、69、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、および93から成る群より選択される、ポリヌクレオチド。

【請求項7】

請求項3に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、該ポリヌクレオチドが、配列番号19、47、49および51からなる群より選択される、ポリヌクレオチド。

【請求項8】

宿主細胞での発現を導くのに好適な少なくとも1つの制御配列に操作可能に連結された請

10

20

30

40

50

求項 6 または 7 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 10】

3'、4'、および 5' 位の 1 つ以上で置換された 2'、6' 置換アセトフェノン基質を対応する置換 (S) - 1 - フェネタノールに立体選択的に還元するための方法であって、該基質を対応する (S) - アルコール生成物に立体選択的に還元または変換するのに好適な反応条件下で、該基質を請求項 1 ~ 2 および 4 ~ 5 のいずれか一項に記載のケトレダクターゼポリペプチドと接触させるステップを含み、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 10、14、18、22、24、28、32、36、38、40、42、44、46、56、58、60、62、64、68、70、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

10

【請求項 11】

3'、4'、および 5' 位の 1 つ以上で置換された 2'、6' 置換アセトフェノン基質を対応する置換 (S) - 1 - フェネタノールに立体選択的に還元するための方法であって、該基質を対応する (S) - アルコール生成物に立体選択的に還元または変換するのに好適な反応条件下で、該基質を請求項 3 に記載のケトレダクターゼポリペプチドと接触させるステップを含み、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 20、48、50 および 52 から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 12】

前記基質が 2'、6' - ジクロロ - 3' フルオロアセトフェノンであり、前記対応する (S) - アルコール生成物が (S) - 1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールであり、かつ、該 (S) - 1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールが 99% を超える立体異性体過剰率で形成される、請求項 10 または 11 に記載の方法。

20

【請求項 13】

構造式 (V I I) の化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物を生成するための方法であって、該方法は、好適な反応条件下で請求項 1 ~ 2 および 4 ~ 5 のいずれか一項に記載のケトレダクターゼポリペプチドを使用して、式 (I) の化合物を式 (I I) の化合物に還元または変換するステップを含み、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 10、14、18、22、24、28、32、36、38、40、42、44、46、56、58、60、62、64、68、70、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

30

【請求項 14】

構造式 (V I I) の化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物を生成するための方法であって、該方法は、好適な反応条件下で請求項 3 に記載のケトレダクターゼポリペプチドを使用して、式 (I) の化合物を式 (I I) の化合物に還元または変換するステップを含み、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 20、48、50 および 52 から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 15】

構造式 (V I I I) の化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物を生成するための方法であって、該方法は、好適な反応条件下で請求項 1 ~ 2 および 4 ~ 5 のいずれか一項に記載のケトレダクターゼポリペプチドを使用して、式 (I) の化合物を式 (I I) の化合物に還元または変換するステップを含み、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 10、14、18、22、24、28、32、36、38、40、42、44、46、56、58、60、62、64、68、70、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

40

【請求項 16】

構造式 (V I I I) の化合物またはその塩、水和物、もしくは溶媒和物を生成するための方法であって、該方法は、好適な反応条件下で請求項 3 に記載のケトレダクターゼポリペ

50

プチドを使用して、式 (I) の化合物を式 (II) の化合物に還元または変換するステップを含み、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 20、48、50 および 52 から選択されるアミノ酸配列を含む、方法。

【請求項 17】

3', 4' および 5' 位の 1 つ以上にて置換された 2', 6' - 置換アセトフェノン、および / または対応する置換 (S) - 1 - フェネタノール、ならびに請求項 1 ~ 2 および 4 ~ 5 のいずれか一項に記載のケトレダクターゼを含む、組成物であって、その基質は、式 (I) の 2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンであり、および該対応する置換 (S) - 1 - フェネタノールが式 (II) の (S) - 1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールであり、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 10、14、18、22、24、28、32、36、38、40、42、44、46、56、58、60、62、64、68、70、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、組成物。

10

【請求項 18】

3', 4' および 5' 位の 1 つ以上にて置換された 2', 6' - 置換アセトフェノン、および / または対応する置換 (S) - 1 - フェネタノール、ならびに請求項 3 に記載のケトレダクターゼを含む、組成物であって、その基質は、式 (I) の 2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンであり、および該対応する置換 (S) - 1 - フェネタノールが式 (II) の (S) - 1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールであり、該ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 20、48、50 および 52 から

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連する出願への相互参照

本願は、米国特許法 § 119 (e) のもとに、2007 年 9 月 13 日に出願された出願番号第 60 / 972, 058 号の利益を主張し、出願番号第 60 / 972, 058 号の内容は、参考として本明細書中に援用される。

【0002】

配列表、表またはコンピュータプログラムへの参照

30

米国特許法施行規則 § 1.821 のもと、376247-017.txt のファイル名で EFS - WEB を介してコンピュータ読み取り可能形態 (CRF) で、ここに同時に提出された配列表は、参考として本明細書中に援用される。配列表の電子コピーは、213 キロバイトのファイルサイズで 2008 年 9 月 13 日に作成された。

【背景技術】

【0003】

ケトレダクターゼ (KRED) またはカルボニルレダクターゼクラス (EC 1.1.1.184) に属する酵素は、対応するプロ立体異性ケトン基質からの、および対応するラセミアルデヒド基質の立体特異性還元による光学活性アルコールの合成に有用である。KRED は通例、ケトンおよびアルデヒド基質に対応するアルコール生成物に変換するが、多くは逆反応、すなわちアルコール基質の対応するケトン / アルデヒド生成物への酸化も触媒し得る。KRED などの酵素によるケトンおよびアルデヒドの還元ならびにアルコールの酸化は、補因子、最も一般的には還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADPH)、ならびに酸化反応のためのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADP) を必要とする。NADH および NADPH は電子供与体として作用するが、NAD および NADP は電子受容体として作用する。ケトレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼは、(その酸化および還元状態で) ホスホリル化または非ホスホリル化補因子のどちらかを受容するが、両方は受容しないことが頻繁に観察される。

40

50

【0004】

KRED酵素は、広範な細菌および酵母に見出すことができる（総説については、非特許文献1；非特許文献2；および非特許文献3を参照）。いくつかのKRED遺伝子および酵素配列、例えば、*Candida magnoliae*（Genbankアクセッション番号JC7338；GI：11360538）*Candida parapsilosis*（Genbankアクセッション番号BAA24528.1；GI：2815409）、*Sporobolomyces salmonicolor*（Genbankアクセッション番号AF160799；GI：6539734）が報告されている。

【0005】

主要な化合物を生成するための多くの化学合成手順を回避するために、ケトレダクターゼは、各種のケトおよびアルデヒド基質のキラルアルコール生成物への酵素変換にますます利用されるようになってきている。このような用途は、生体触媒によるケトンおよびアルデヒド還元のためにケトレダクターゼを発現する全細胞を利用できるか、または全細胞中の複数のケトレダクターゼの存在によって所望の生成物の立体純度および収率に悪影響を及ぼす例では精製酵素を使用できる。インビトロ用途では、グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）、ギ酸デヒドロゲナーゼなどの補因子（NADHまたはNADPH）再生酵素をケトレダクターゼと併せて使用する。有用な化学化合物を産生するためにケトレダクターゼを使用する例は、4-クロロアセトアセテートエステルの不斉還元（非特許文献4；非特許文献5；米国特許第5,559,030号；米国特許第5,700,670号および米国特許第5,891,685号）、ジオキソカルボン酸の還元（例えば、米国特許第6,399,339号）、（S）クロロ-5-ヒドロキシ-3-オキソヘキサン酸tert-ブチルノの還元（例えば、米国特許第6,645,746号および特許文献1）、ピロロトリアジン系化合物の還元（例えば、米国特許第2006/0286646号）；置換アセトフェノンの還元（例えば、米国特許第6,800,477）；およびケトチオランの還元（特許文献2）を含む。

【0006】

各種のケト基質のその対応するキラルアルコール生成物への変換を実施するために使用可能である他のケトレダクターゼ酵素を同定することが望ましい。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

【特許文献1】国際公開第01/40450号パンフレット

【特許文献2】国際公開第2005/054491号パンフレット

【非特許文献】

【0008】

【非特許文献1】Kraus and Waldman, 1995, Enzyme catalysis in organic synthesis, Vols. 1 & 2. VCH Weinheim

【非特許文献2】Faber, K., 2000, Biotransformations in organic chemistry, 4th Ed. Springer, Berlin Heidelberg New York

【非特許文献3】Hummel and Kula, 1989, Eur. J. Biochem. 184: 1-13

【非特許文献4】Zhou, 1983, J. Am. Chem. Soc. 105: 5925-5926

【非特許文献5】Santaniello, J. Chem. Res. (S) 1984: 132-133

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本開示は、所定のケト基質をその対応するアルコール生成物に立体選択的に還元することと、*L. kefir* (配列番号4)もしくは*L. brevis* (配列番号2)もしくは*L. minor* (配列番号98)より得た天然に存在する野生型KRED酵素と比較したとき、または他の改変ケトレダクターゼ酵素と比較したとき、改良された特性を有することとが可能である、改変ケトレダクターゼ(「KRED」)酵素を提供する。本開示では、*Lactobacillus*種由来の天然に存在するケトレダクターゼが化合物アセトフェノンを(R)-1-フェネタノールに還元することが示されている。野生型酵素はアセトフェノンのその対応する(R)-アルコールへの変換について一般に選択的であるため、これらの天然に存在する酵素は(R)-選択性ケトレダクターゼ、すなわち(R)-ケトレダクターゼである。置換アセトフェノン、例えば、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンでは、このような野生型*L. kefir*または*L. brevis*または*L. minor*ケトレダクターゼ酵素は、置換アセトフェノン基質に対して、存在するとしてもわずかな活性を示す。しかし、野生型*Lactobacillus*種ケトレダクターゼに由来する本開示の改変ケトレダクターゼ酵素は、アセトフェノンを(S)-1-フェネタノールに還元することができる。それゆえ、本明細書に記載するケトレダクターゼは、アセトフェノンの還元では野生型*L. kefir*または*L. brevis*または*L. minor*ケトレダクターゼと比較して、逆のエナンチオ選択性を特徴とする。したがって、開示のこのようなポリペプチドは、(S)-選択性ケトレダクターゼ、すなわち(S)-ケトレダクターゼと呼ばれる。逆のエナンチオ選択性は、野生型ケトレダクターゼ酵素の190位の残基(すなわちX190)をチロシンでない残基に、好ましくは非芳香族残基に、特にプロリン残基に変異させることに基づいている。

【0010】

さらに、本明細書に記載した改変酵素は、変更された立体選択性に加えて、1つ以上の改良された特性を有することができる。例えば、改変ケトレダクターゼポリペプチドは、基質を生成物に還元するための野生型ケトレダクターゼ酵素と比較して酵素活性の上昇を有することが可能である、および/または(S)エナンチオマーに対する立体選択性をさらに上昇させる。酵素特性の改良は特に、熱安定性、溶媒安定性の向上、または生成物阻害の低下も含み得る。本明細書でさらに開示するように、野生型ケトレダクターゼは置換アセトフェノンの還元でわずかな活性を示すが、開示は、置換アセトフェノンの2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに還元または変換することができるケトレダクターゼを提供する。

【0011】

したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、配列番号2、4または98のX190に対応する残基にチロシンでない残基を有するケトレダクターゼポリペプチドに関する。いくつかの実施形態において、この残基は非芳香族残基、例えば、脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基である。いくつかの実施形態において、本残基はプロリンである。

【0012】

X190に対応する残基での特徴に加えて、ケトレダクターゼは、配列番号2、4、または98の配列と比較して他の残基位置に1つ以上の残基相違を有することができる。いくつかの実施形態において、本明細書のケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基に脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンを含む非芳香族残基を有する、配列番号2、4または98に基づく参照配列と比較して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、そのケトレダクターゼポリペプチドがX190に対応する残基にチロシン以外、特に非芳香族残基である残基を有することを条件とする。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基が脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基であるア

ミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基がアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリン、特にプロリンであるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、これらの残基相違は、基質に対する酵素活性の上昇などの改良された特性を生じる。改良された特性は野生型ケトレダクターゼ酵素に関連または改変ケトレダクターゼ酵素に関連し得る。例えば、いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼ酵素の改良は、測定可能な活性によって99%を超える立体異性体過剰率で基質を生成物に変換することが可能であり、したがって野生型L.kefirまたはL.brevissまたはL.minorケトレダクターゼと比較して改良された、配列番号6に対応するアミノ酸配列を有する改変酵素の特性と比較される。1つ以上の改良された酵素特性を生じ得る各種の残基相違は、詳細に説明される。いくつかの実施形態において、これらの改変ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号95、96および119（または残基90~211などのその領域）に配列された配列式に基づく。

10

【0013】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも改良された率で変換することができる。酵素活性に関して配列番号6よりも改良されている例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

20

【0014】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも改良された率で変換することができ、ポリペプチドは、配列番号6の配列を有するポリペプチドと比較して改良された熱安定性も有する。このような改良を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、16、18、20、22、26、28、30、32、34、38、40、42、44、46、54、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

30

【0015】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約450%大きい率で変換することができる。このような改良が可能である例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、10、14、16、18、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

40

【0016】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約450%大きい率で変換することができ、ポリペプチドは、配列番号6の配列を有するポリペプチドと比較して改良された熱安定性

50

も有する。このような特性を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号 8、16、18、22、26、28、30、32、34、38、40、42、44、46、54、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0017】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2，6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号 6 を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約 1500% 大きい率で変換することができる。このような改良が可能である例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号 18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

10

【0018】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2，6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号 6 を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約 1500% 大きい率で変換することができ、ポリペプチドは、配列番号 6 の配列を有するポリペプチドと比較して改良された熱安定性も有する。このような特性を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号 18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

20

【0019】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質の量に対して約 1 重量%未満の量のポリペプチドを用いて実施するとき、約 24 時間未満で 2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンの少なくとも約 95% を(S)-1-[2，6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに少なくとも約 99% の立体異性体過剰率で変換することができる。この能力を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

30

【0020】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2，6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、配列番号 6 を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約 450% 大きい率で変換することができ、ポリペプチドは 50 で 2 時間の熱処理の後に、配列番号 16 の配列を有するポリペプチドよりも少なくとも約 400% 大きい率で基質を生成物に変換することもできる(配列番号 16 のポリペプチドも同じ熱処理によって処理された場合)。このような特性を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号 18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

40

【0021】

いくつかの実施形態において、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2，6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに変換できる改良されたケトレダクターゼポリペプチドは、X190 に対応する残基に脂肪族、拘束、非極性、またはシステイン残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロ

50

リンを含む非芳香族残基を有する、配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列の残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインと少なくとも約 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % 同一であるアミノ酸配列を有する領域またはドメインを含むが、但し、そのケトレダクターゼポリペプチド領域またはドメインが X190 に対応する残基にチロシン以外の残基を有することを条件とする。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190 に対応する残基が非芳香族残基である参照配列の残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインを有する。いくつかの実施形態において、X190 に対応するこの残基は、脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基であり得る。いくつかの実施形態において、X190 に対応する残基は、アラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリン、特にプロリンであり得る。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、参照配列と比較してドメインまたは領域に 1 つ以上の残基相違を有することができる。参照配列と異なり得る各種の残基位置について詳細な説明を与える。

10

【0022】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載した改変ケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチドまたは高ストリンジェント条件でこのようなポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、プロモータおよびコードされた改変ケトレダクターゼに有用な他の制御要素を含むことができ、特定の所望の発現系に対して最適化されたコドンを利用できる。改変ケトレダクターゼをコードする例示的なポリヌクレオチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、および 93 に対応する配列を含むポリヌクレオチドを含む。

20

【0023】

別の態様において、本開示は、本明細書に記載するポリヌクレオチドおよび/または発現ベクターを含む宿主細胞を提供する。宿主細胞は *L. kefir* もしくは *L. brevis* であり得るか、またはそれらは異なる生物であり得る。宿主細胞は本明細書に記載する改変ケトレダクターゼ酵素の発現および単離に使用できるか、またはそれらは式 (I) もしくは (III) の置換アセトフェノン基質の、式 (II) もしくは (IV) の対応する (S) - アルコール生成物への変換にそれぞれ直接使用できる。

30

【0024】

全細胞、細胞抽出物または精製ケトレダクターゼ酵素を用いて方法を実施するかにかかわらず、単一のケトレダクターゼ酵素が使用され得るか、または 2 つ以上のケトレダクターゼ酵素の混合物が使用され得る。

【0025】

上記のように、本明細書に記載するケトレダクターゼは、3'、4'、および 5' 位の 1 つ以上において場合により置換可能である 2'、6' - 置換アセトフェノンの、対応する (S) - アルコール生成物への還元反応を触媒できる。

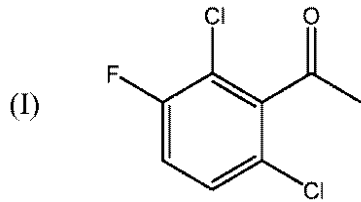
40

【0026】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼ酵素は、構造式 (I) のケトン、2'、6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンを

【0027】

【化 1】

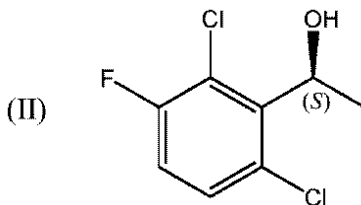


構造式 (I I) の対応するキラルアルコール生成物、(S) - 1 - [2 , 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル] - エタノールに還元または変換することができる。

【 0 0 2 8 】

10

【化 2】

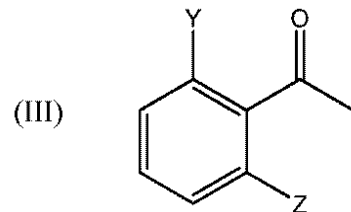


いくつかの実施形態において、本明細書に記載するケトレダクターゼ酵素は、3'、4'、および5'位の1つ以上で場合により置換された構造式 (I I I) の2'、6'-置換アセトフェノン化合物

20

【 0 0 2 9 】

【化 3】

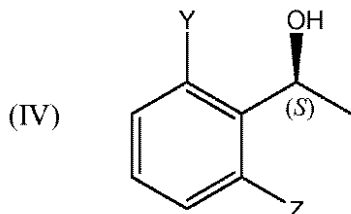


30

(式中、YおよびZは、CH₃、CF₃、NH₂、OH、OCH₃、Cl、およびBrより独立して選択される)の、構造式 (I V) の対応するキラルアルコール生成物への還元を触媒できる。

【 0 0 3 0 】

【化 4】



40

したがって、いくつかの実施形態において、本開示は、3'、4'、および5'位の1つ以上で場合により置換された2'、6'置換アセトフェノン基質を対応する置換 (S) - フェネタノールに還元する方法を提供し、該方法は、基質を対応する置換 (S) - フェネタノールに還元または変換するのに好適な反応条件下で、基質を本明細書に記載するケトレダクターゼと接触させるステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、基質は約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または99.9%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。

【 0 0 3 1 】

50

いくつかの実施形態において、本開示は、式(ⅠⅠⅠ)の2', 6'置換アセトフェノン(ⅠⅤ)の対応する置換(S)-フェネタノールに還元する方法を提供し、該方法は、式(ⅠⅠⅠ)の基質を式(ⅠⅤ)の対応する置換(S)-フェネタノール生成物に還元または変換するのに好適な反応条件下で、基質を本明細書に記載するケトレダクターゼと接触させるステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、基質は約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または99.9%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。

【0032】

いくつかの実施形態において、本開示は、式(Ⅰ)の2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質を式(ⅠⅠ)のその対応する(S)-アルコール生成物、(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに還元する方法を提供し、該方法は、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに還元または変換するのに好適な反応条件下で、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを本明細書に記載するケトレダクターゼと接触またはインキュベートするステップを含む。本方法のいくつかの実施形態において、基質は約85%、90%、95%、99%、または99.9%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。いくつかの実施形態において、基質は約85%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元され、ケトレダクターゼポリペプチドは配列番号95、96または119の配列式に基づくアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、基質は約99%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元され、該方法に使用されるケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含む。

【0033】

この方法のいくつかの実施形態において、方法が2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質の量に対して約1重量%未満の量でケトレダクターゼポリペプチドを用いて実施されるとき、基質の少なくとも約95%が24時間未満で約99%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元され、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含む。

【0034】

いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書に記載するケトレダクターゼならびに3', 4'または5'位の1つ以上にて場合により置換された2, 6置換アセトフェノン、および/または対応する置換(S)-フェネタノールの組成物を提供する。いくつかの実施形態において、組成物は本明細書に記載するケトレダクターゼならびに式(Ⅰ)の化合物および/または式(ⅠⅠ)の化合物を含む。いくつかの実施形態において、組成物は本明細書に記載するケトレダクターゼならびに式(ⅠⅠⅠ)の化合物および/または式(ⅠⅤ)の化合物を含む。いくつかの実施形態において、組成物は本明細書に記載するケトレダクターゼ、ならびに式(Ⅴ)の化合物および/または式(ⅤⅠ)の化合物を含む。いくつかの実施形態において、組成物は補因子再成系をさらに含むことができる。

【0035】

いくつかの実施形態において、本開示は、WO06021886、WO06021884、WO06021881、およびWO04076412に記載されたタンパク質キナーゼ阻害薬の合成での改変ケトレダクターゼの使用に関する。いくつかの実施形態において、プロテインキナーゼ阻害薬の合成方法において、方法のステップは、基質である式(Ⅰ)の2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを本開示のケトレダクターゼを用いて、式(ⅠⅠ)のその対応する(S)-アルコール生成物、(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに還元または変換することを含むこと

ができる。

したがって、本発明は、以下の項目を提供する：

(項目1)

2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質を(S)-1-(2, 6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エタノールに少なくとも約85%の立体異性体過剰率で立体選択的に還元することができるケトレダクターゼポリペプチド。

(項目2)

X190に対応する残基にプロリンを有する配列番号2、4または98に基づく参照配列と少なくとも約85%同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、ケトレダクターゼアミノ酸配列がX190に対応する残基に非芳香族残基を有することを条件とする、項目1に記載のポリペプチド。

10

(項目3)

上記ケトレダクターゼアミノ酸配列が、X190に対応する残基に脂肪族、非極性、拘束された、またはシステイン残基を有する、項目2に記載のポリペプチド。

(項目4)

上記ケトレダクターゼアミノ酸配列が、X190に対応する残基にプロリンを有する、項目2に記載のポリペプチド。

(項目5)

上記ケトレダクターゼが、次の特徴：

X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である；

20

X16に対応する残基が、極性残基である；

X43に対応する残基が、非極性または極性残基である；

X60に対応する残基が、芳香族または非極性、または脂肪族残基である；

X94に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基である；

X95に対応する残基が、非極性または脂肪族残基である；

X96に対応する残基が、極性または酸性残基である；

X97に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基である；

X120に対応する残基が、芳香族、非極性または脂肪族残基である；

X125に対応する残基が、極性または非極性残基である；

30

X142に対応する残基が、極性残基、特にセリンまたはアスパラギンである；

X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X149に対応する残基が、非極性または芳香族残基である；

X150に対応する残基が、拘束されたまたは酸性残基である；

X152に対応する残基が、非極性または極性残基である；

X196に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；

X202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である；

X205に対応する残基が、塩基性、非極性または脂肪族残基である；

X206に対応する残基が、非極性または芳香族残基である、の1つ以上をさらに有するアミノ酸配列を含み；ならびに

40

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1つ以上の残基相違を場合により有する、項目2に記載のポリペプチド。

(項目6)

次の特徴：

X7に対応する残基が、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、またはアスパラギンである；

X16に対応する残基が、セリンである；

X43に対応する残基が、イソロイシンである；

X60に対応する残基が、アラニンである；

X94に対応する残基が、アラニン、バリンまたはシステインである；

50

<p><u>X 9 5 に対応する残基が、イソロイシンまたはロイシンである；</u> <u>X 9 6 に対応する残基が、セリン、アスパラギン、トレオニンまたはグルタミン酸である；</u></p>	
<p><u>X 9 7 に対応する残基が、リジン、トレオニン、バリン、アルギニン、メチオニン、またはイソロイシンである；</u> <u>X 1 2 0 に対応する残基が、フェニルアラニンまたはバリンである；</u></p>	
<p><u>X 1 2 5 に対応する残基が、グリシンまたはセリンである；</u> <u>X 1 4 2 に対応する残基が、アスパラギンである；</u> <u>X 1 4 7 に対応する残基が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、またはグルタミンである；</u></p>	10
<p><u>X 1 4 9 に対応する残基が、グリシンまたはフェニルアラニンである；</u> <u>X 1 5 0 に対応する残基が、アスパラギン酸またはヒスチジンである；</u> <u>X 1 5 2 に対応する残基が、セリン、トレオニン、またはメチオニンである；</u></p>	
<p><u>X 1 9 6 に対応する残基が、バリン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；</u> <u>X 2 0 2 に対応する残基が、アラニン、トリプトファン、チロシン、またはメチオニンである；</u></p>	
<p><u>X 2 0 5 に対応する残基が、アルギニンである；および</u> <u>X 2 0 6 に対応する残基が、メチオニンまたはチロシンである、の 1 つ以上をさらに有するアミノ酸配列を含み；ならびに</u></p>	20
<p><u>上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。</u> <u>(項目 7)</u> <u>次の特徴：</u></p>	
<p><u>X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；および</u> <u>X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに</u></p>	
<p><u>上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。</u> <u>(項目 8)</u> <u>次の特徴：</u></p>	30
<p><u>X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である；</u> <u>X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；および</u> <u>X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに</u></p>	
<p><u>上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。</u> <u>(項目 9)</u> <u>次の特徴：</u></p>	40
<p><u>X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である；</u> <u>X 9 7 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基である；および</u> <u>X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；</u></p>	
<p><u>X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに</u> <u>上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。</u> <u>(項目 10)</u> <u>次の特徴：</u></p>	50

X 9 4 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基である；
X 9 6 に対応する残基が、極性または酸性残基である；
X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基；
特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 1)

次の特徴：

X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である；

X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X 1 9 6 に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；

X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 2)

次の特徴：

X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X 1 9 6 に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；

X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 つ以上の残基相違を場合により有する、項目 2 に記載のポリペプチド。

(項目 1 3)

上記立体異性体過剰率が少なくとも約 9 0 % である、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 4)

上記立体異性体過剰率が少なくとも約 9 9 % である、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 5)

配列番号 6、8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、および 9 4 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 4 に記載のポリペプチド。

(項目 1 6)

上記ポリペプチドが、配列番号 6 の配列を有する上記ケトレダクターゼポリペプチドによって可能な率よりも高い率で基質を生成物に還元することがさらに可能である、項目 1 に記載のポリペプチド。

(項目 1 7)

配列番号 8、1 0、1 2、1 4、1 6、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、2 8、3 0、3 2、3 4、3 6、3 8、4 0、4 2、4 4、4 6、4 8、5 0、5 2、5 4、5 6、5 8、6 0、6 2、6 4、6 6、6 8、7 0、7 2、7 4、7 6、7 8、8 0、8 2、8 4、8 6、8 8、9 0、9 2、および 9 4 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 1 6 に記載のポリペプチド。

(項目 1 8)

上記ポリペプチドが、配列番号 6 の配列を有する上記ケトレダクターゼポリペプチドによって可能な率よりも少なくとも約 4 5 0 % 大きい率で基質を生成物に還元することがさらに可能である、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 1 9)

10

20

30

40

50

配列番号 8、10、14、16、18、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 18 に記載のポリペプチド。

(項目 20)

上記ポリペプチドが、配列番号 6 の配列を有する上記ケトレダクターゼポリペプチドによって可能な率よりも少なくとも約 1500% 大きい率で基質を生成物に還元することがさらに可能である、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 21)

配列番号 18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 21 に記載のポリペプチド。

10

(項目 22)

2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質の量に対して約 1 重量% 未満の量のポリペプチドを用いて実施するとき、約 24 時間未満で 2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質の少なくとも約 95% を (S)-1-(2, 6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エタノールに変換することができる、項目 4 に記載のポリペプチド。

(項目 23)

配列番号 18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 22 に記載のポリペプチド。

20

(項目 24)

ケトレダクターゼポリペプチドであって、X190 に対応する残基にプロリンを有する配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列の残基 90 ~ 211 と少なくとも約 85% 同一であるアミノ酸配列を有するドメインを含むが、但し、ケトレダクターゼポリペプチドアミノ酸配列が X190 に対応する残基に非芳香族残基を有することを条件とする、ケトレダクターゼポリペプチド。

(項目 25)

上記ケトレダクターゼドメインは、X190 に対応する残基が脂肪族、非極性、拘束された、またはシステイン残基であるアミノ酸配列を含む、項目 24 に記載のポリペプチド。

30

(項目 26)

上記ケトレダクターゼドメインは、X190 に対応する残基がプロリンであるアミノ酸配列を含む、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 27)

上記ケトレダクターゼポリペプチドドメインが、次の特徴：

X94 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基である；

X95 に対応する残基が、非極性または脂肪族残基である；

X96 に対応する残基が、極性または酸性残基である；

X97 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基である；

40

X120 に対応する残基が、芳香族、非極性、または脂肪族残基である；

X125 に対応する残基が、極性または非極性残基である；

X142 に対応する残基が、極性残基、特にセリンまたはアスパラギンである；

X147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X149 に対応する残基が、非極性または芳香族残基である；

X150 に対応する残基が、拘束されたまたは酸性残基である；

X152 に対応する残基が、非極性または極性残基である；

X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；

X202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である；

X205 に対応する残基が、塩基性、非極性または脂肪族残基である；

50

X 2 0 6 に対応する残基が、非極性または芳香族残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド。

(項目 2 8)

残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチドドメインが、次の特徴：

X 9 4 に対応する残基が、アラニン、バリンまたはシステインである；

X 9 5 に対応する残基が、イソロイシンまたはロイシンである；

X 9 6 に対応する残基が、セリン、アスパラギン、トレオニンまたはグルタミン酸である；

X 9 7 に対応する残基が、リジン、トレオニン、バリン、アルギニン、メチオニン、またはイソロイシンである；

X 1 2 0 に対応する残基が、フェニルアラニンまたはバリンである；

X 1 2 5 に対応する残基が、グリシンまたはセリンである；

X 1 4 2 に対応する残基が、アスパラギンである；

X 1 4 7 に対応する残基が、フェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、またはグルタミンである；

X 1 4 9 に対応する残基が、グリシンまたはフェニルアラニンである；

X 1 5 0 に対応する残基が、アスパラギン酸またはヒスチジンである；

X 1 5 2 に対応する残基が、セリン、トレオニン、またはメチオニンである；

X 1 9 0 に対応する残基が、アラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；

X 1 9 6 に対応する残基が、バリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；

X 2 0 2 に対応する残基が、アラニン、トリプトファン、チロシン、またはメチオニンである；

X 2 0 6 に対応する残基が、メチオニンまたはチロシンである、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド。

(項目 2 9)

残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチドドメインが、次の特徴：

X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 0)

残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチド領域が、次の特徴：

X 9 7 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基である；

X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 9 0 ~ 2 1 1 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド。

(項目 3 1)

10

20

30

40

50

残基 90 ~ 211 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチド領域が、次の特徴：

X 94 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基である；

X 96 に対応する残基が、極性または酸性残基である；

X 147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに；

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 90 ~ 211 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 32)

残基 90 ~ 211 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチド領域が、次の特徴：

X 147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；

X 196 に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；

X 202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 90 ~ 211 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 33)

残基 90 ~ 211 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチド領域が、次の特徴：

X 147 に対応する残基が、ロイシンである；

X 196 に対応する残基が、ロイシンである；

X 202 に対応する残基が、トリプトファンである、の 1 つ以上を有するアミノ酸配列を含み；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 90 ~ 211 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 34)

配列番号 2、4 または 98 に基づく上記参照配列の残基 1 ~ 89 に対応するアミノ酸配列を有する領域をさらに含み、残基 1 ~ 89 に対応する上記領域が次の特徴：

X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である、を有し；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 1 ~ 89 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 35)

配列番号 2、4 または 98 に基づく上記参照配列の残基 1 ~ 89 に対応するアミノ酸配列を有する領域をさらに含み、残基 1 ~ 89 に対応する上記領域が次の特徴：

X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である；

X 16 に対応する残基が、極性残基である；

X 43 に対応する残基が、非極性または極性残基である、を有し；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 1 ~ 89 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 24 に記載のポリペプチド。

(項目 36)

配列番号 2、4 または 98 に基づく上記参照配列の残基 1 ~ 89 に対応するアミノ酸配列を有する領域をさらに含み、残基 1 ~ 89 に対応する上記領域が次の特徴：

X 7 に対応する残基が、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、またはアスパラギンである；

X 16 に対応する残基が、セリンである；

X 4 3 に対応する残基が、イソロイシンである、を有し；ならびに
上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 1 ～ 8 9 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド
。

(項目 3 7)

配列番号 2、4 または 9 8 に基づく上記参照配列の残基 1 ～ 8 9 に対応するアミノ酸配列を有する領域をさらに含み、残基 1 ～ 8 9 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチド領域が次の特徴：

X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基である；

X 1 6 に対応する残基が、極性残基である；

X 4 3 に対応する残基が、非極性または極性残基である；

X 6 0 に対応する残基が、芳香族または非極性、または脂肪族残基である、を有し；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 1 ～ 8 9 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド
。

(項目 3 8)

配列番号 2、4 または 9 8 に基づく上記参照配列の残基 1 ～ 8 9 に対応するアミノ酸配列を有する領域をさらに含み、残基 1 ～ 8 9 に対応する上記ケトレダクターゼポリペプチド領域が次の特徴：

X 7 に対応する残基が、グリシン、ヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、またはアスパラギンである；

X 1 6 に対応する残基が、セリンである；

X 4 3 に対応する残基が、イソロイシンである；

X 6 0 に対応する残基が、アラニンである、を有し；ならびに

上記アミノ酸配列が、上記参照配列と比較して残基 1 ～ 8 9 に対応するドメイン内の他のアミノ酸残基に 1 つ以上の相違を場合により有し得る、項目 2 4 に記載のポリペプチド
。

(項目 3 9)

改変ケトレダクターゼポリペプチドであって、上記改変ケトレダクターゼポリペプチドが由来する野生型ケトレダクターゼと比較して、2' , 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノン基質を (S) - 1 - (2 , 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールに還元するための逆の立体選択性が可能である、改変ケトレダクターゼポリペプチド。

(項目 4 0)

アセトフェノンを (S) - 1 - フェネタノールに立体選択的に還元することができる、野生型 L a c t o b a c i l l u s ケトレダクターゼに由来する、改変ケトレダクターゼポリペプチド。

(項目 4 1)

上記ポリペプチドがアセトフェノンを (S) - 1 - フェネタノールに少なくとも約 9 0 % の立体異性体過剰率で立体選択的に還元することができる、項目 4 0 に記載のポリペプチド。

(項目 4 2)

上記ポリペプチドがアセトフェノンを (S) - 1 - フェネタノールに少なくとも約 9 9 % の立体異性体過剰率で立体選択的に還元することができる、項目 4 0 に記載のポリペプチド。

(項目 4 3)

上記改変ポリペプチドが配列番号 2 または 4 または 9 8 の X 1 9 0 に対応する残基に非芳香族残基を含む、項目 4 0 に記載のポリペプチド。

(項目 4 4)

10

20

30

40

50

項目 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

(項目 4 5)

配列番号 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、および 93 から成る群より選択される、項目 4 4 に記載のポリヌクレオチド。

(項目 4 6)

宿主細胞での発現を導くのに好適な少なくとも 1 つの制御配列に操作可能に連結された項目 4 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

10

(項目 4 7)

上記制御配列がプロモータを含む、項目 4 6 の記載の発現ベクター。

(項目 4 8)

上記プロモータが E . c o l i プロモータを含む、項目 4 7 に記載のベクター。

(項目 4 9)

上記制御配列が分泌シグナルを含む、項目 4 7 の記載の発現ベクター。

(項目 5 0)

項目 4 6 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

(項目 5 1)

E . c o l i である、項目 5 0 に記載の宿主細胞。

20

(項目 5 2)

発現ベクターを含むコドンが宿主細胞での発現に最適化されている、項目 5 0 に記載の宿主細胞。

(項目 5 3)

3'、4'、および 5' 位の 1 つ以上で場合により置換された 2'、6' 置換アセトフェノン基質を対応する置換 (S) - 1 - フェネタノールに立体選択的に還元する方法であって、上記基質を対応する置換 (S) - アルコール生成物に立体選択的に還元または変換するのに好適な反応条件下で、上記基質を項目 1 ~ 4 3 のいずれか一項に記載のケトレダクターゼポリペプチドと接触させるステップを含む、方法。

(項目 5 4)

上記基質が 2'、6' - ジクロロ - 3' フルオロアセトフェノンであり、上記対応する (S) - アルコール生成物が (S) - 1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールである、項目 5 3 に記載の方法。

30

(項目 5 5)

(S) - 1 - (2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールが 99% を超える立体異性体過剰率で形成される、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 6)

上記ケトレダクターゼポリペプチドが、配列番号 6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む、項目 5 3 に記載の方法。

40

(項目 5 7)

上記方法が少なくとも 200 g / L の基質および 2 g / L 未満のポリペプチドを用いて実施されるとき、上記基質の少なくとも約 95% が 24 時間未満で上記生成物に還元される、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 8)

上記ケトレダクターゼ酵素を発現する全細胞、またはそのような細胞の抽出物もしくは溶解物を用いて実施される、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 9)

50

上記ケトレダクターゼが、単離および／または精製され、そして上記還元反応が該ケトレダクターゼの補因子および場合によっては該補因子の再生系の存在下で行われる、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 6 0)

上記補因子再生系がグルコースデヒドロゲナーゼおよびグルコース；ギ酸デヒドロゲナーゼおよびギ酸エステル；またはイソプロパノールおよび第二級アルコールデヒドロゲナーゼを含む、項目 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

上記第二級アルコールデヒドロゲナーゼが、ケトレダクターゼである、項目 6 0 に記載の方法。

(項目 6 2)

3' , 4' および 5' 位の 1 つ以上にて場合により置換された 2' , 6' - 置換アセトフェノン、および／または対応する置換 (S) - 1 - フェネタノール、ならびに項目 1 に記載のケトレダクターゼを含む、組成物。

(項目 6 3)

上記基質が式 (I) の 2' , 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンであり、および上記対応する置換 (S) - 1 - フェネタノールが式 (II) の (S) - 1 - (2 , 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル) エタノールである、項目 6 2 に記載の組成物。

(項目 6 4)

補因子再生系をさらに含む、項目 6 2 に記載の組成物。

(項目 6 5)

上記補因子再生系がグルコースデヒドロゲナーゼおよびグルコース；ギ酸デヒドロゲナーゼおよびギ酸エステル；またはイソプロパノールおよび第二級アルコールデヒドロゲナーゼを含む、項目 6 4 に記載の組成物。

【図面の簡単な説明】

【0036】

【図 1】式 (I) の基質化合物、2' , 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンを式 (II) の、対応するキラルアルコール生成物、(S) - 1 - [2 , 6 , - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル] - エタノールへの変換におけるケトレダクターゼ (KRED) の役割を示す。この反応において、基質は生体触媒的に対応する (S) - アルコールに還元される。この還元は、本明細書に記載する KRED および NADPH などの補因子を使用する。グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を使用して NADP⁺ を NADPH に変換／リサイクルする。グルコースはグルコン酸に変換され、グルコン酸は次に水酸化ナトリウムの添加によってそのナトリウム塩 (グルコン酸ナトリウム) に変換される。

【発明を実施するための形態】

【0037】

定義

本明細書において用いる場合、以下の用語は、以下の意味を有すると解釈する。

【0038】

「ケトレダクターゼ」および「KRED」は、カルボニル基をその対応するアルコールに還元する酵素能力を有するポリペプチドを指すために、本明細書では交換可能に用いている。より具体的には、本明細書のケトレダクターゼポリペプチドは、上記の式 (I) の化合物を上記の式 (II) の対応する生成物に立体選択的に還元することができる。前記ポリペプチドは、還元剤として補因子である還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NADH) または還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリリン酸 (NADPH) を代表的に利用する。本明細書において用いる場合のケトレダクターゼは、天然由来 (野生型) ケトレダクターゼ、ならびに人間の操作によって生成された非天然由来の操作されたポリペプチドを含む。

【0039】

「コーディング配列」は、タンパク質のアミノ酸配列をコードする、核酸のその部分 (

10

20

30

40

50

例えば、遺伝子)を指す。

【0040】

「天然由来の」または「野生型」は、自然界で見つけられる形態を指す。例えば、天然由来または野生型ポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列は、自然界の源から単離することができ、人間の操作によって故意に修飾されていない、生物体内に存在する配列である。

【0041】

例えば細胞、核酸またはポリペプチドに関して用いるときの「組換え体」は、そうしなければ自然界に存在しないであろう方法で修飾された、またはそれと同一のものであるが合成材料からおよび/もしくは組換え技術を用いる操作によって生産もしくは誘導された、材料、またはその材料の自然なもしくは天然の形態に対応する材料を指す。非限定的な例としては、数ある中でも、天然(非組換え)形態のその細胞内では見つけられない遺伝子を発現する組換え細胞、またはそうでなければ異なるレベルで発現される天然遺伝子を発現する組換え細胞が挙げられる。

【0042】

「配列同一性百分率」および「相同性百分率」は、ポリヌクレオチドおよびポリペプチド間の比較を指すために本明細書では交換可能に用いており、これらは、ある比較ウィンドウに関して2つの最適にアラインされた配列を比較することによって決定され、この場合、その比較ウィンドウ内のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の部分は、それら2配列の最適なアラインメントのために、(付加または欠失を含まない)参照配列と比較して付加または欠失(すなわち、ギャップ)を含むことがある。前記百分率は、同一核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列内に出現する位置の数を決定して一致した位置の数を得、その一致した位置の数を比較ウィンドウ内の全位置数で割り、その結果に100をかけて配列同一性百分率を得ることによって計算することができる。あるいは、前記百分率は、同一核酸塩基もしくはアミノ酸残基が両方の配列内に出現する位置または核酸塩基もしくはアミノ酸残基がギャップとアラインされる位置の数を決定して一致した位置の数を得、その一致した位置の数を比較ウィンドウ内の全位置数で割り、その結果に100をかけて配列同一性百分率を得ることによって計算することができる。2つの配列をアラインするために利用できる多くの確立されたアルゴリズムがあることは当業者に理解される。比較のための最適な配列アラインメントは、例えば、SmithおよびWaterman, 1981, Adv. Appl. Math. 2: 482の局所的相同性アルゴリズムによって、NeedlemanおよびWunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アラインメントアルゴリズムによって、PearsonおよびLipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性探索法によって、これらのアルゴリズム(GCG Wisconsin Software Packageの中のGAP、BESTFIT、FASTA、およびTFASTA)のコンピュータでの実施によって、または目視検査(一般に、Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubelら編, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc.とJohn Wiley & Sons, Inc.との合同ベンチャー(1995年補遺)(Ausubel)参照)によって行うことができる。配列同一性パーセントおよび配列類似性パーセントの決定に適するアルゴリズムの例は、BLASTおよびBLAST2.0アルゴリズムであり、これらは、それぞれ、Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403-410およびAltschulら, 1977, Nucleic Acids Res. 3389-3402に記載されている。BLAST分析を行うためのソフトウェアは、米国国立生物工学情報センター(National Center for Biotechnology Information)ウェブサイトを通して公的に入手することができる。このアルゴリズムは、データベース配列内の同じ長さのワードとアラインしたときある正の値の閾値スコアTと一致するまたはある正の値の閾値スコアTを満たす、クエリ配列中の長さWの短い

10

20

30

40

50

ワードを特定することによって、高いスコアになる配列の対 (high scoring sequence pair) (HSP) を先ず特定することを含む。T は、隣接ワードスコア閾値と呼ばれる (Altschulら、上記文献)。これらの最初の隣接ワードヒットは、それらを含むより長いHSPを見つける検索を開始するためのシードとしての役割を果たす。その後、累積アラインメントスコアを増加することができる限り、そのワードヒットをそれぞれの配列に沿って両方向に伸長する。累積スコアは、ヌクレオチド配列については、パラメータM (1対の一致残基に対する報酬スコア；常に、 > 0) およびN (不一致残基に対するペナルティスコア；常に、 < 0) を用いて計算する。アミノ酸配列については、スコアリング行列を用いて累積スコアを計算する。それぞれの方向におけるワードヒットの伸長は、累積アラインメントスコアがその最大達成値から量Xだけ落ちると；累積スコアが1つ以上の負のスコアの残基アラインメントの累積に起因してゼロ以下になると；またはいずれかの配列の末端に達すると、停止される。BLASTアルゴリズムパラメータW、TおよびXによって、アラインメントの感度および速度が決まる。BLASTNプログラム (ヌクレオチド配列について) は、デフォルトとして11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、 $M = 5$ 、 $N = -4$ 、および両鎖の比較を用いる。アミノ酸配列についてのBLASTPプログラムは、デフォルトとして3のワード長 (W)、10の期待値 (E)、およびBLOSUM62スコアリング行列を用いる (HenikoffおよびHenikoff, 1989, Proc Natl Acad Sci USA 89: 10915 参照)。配列アラインメントおよび配列同一%の例示的判定には、用意されたデフォルトパラメータを用いて、GCG Wisconsin Software package (ウィスコンシン州、マディソンのAccelrys) 中のBESTFITまたはGAPプログラムを利用することができる。

【0043】

「参照配列」は、配列比較のための基準として用いられる規定された配列を指す。参照配列は、より大きな配列のサブセット、例えば、完全長遺伝子またはポリペプチド配列のセグメントである場合もある。一般に、参照配列は、少なくとも20ヌクレオチドもしくはアミノ酸残基の長さ、少なくとも25残基の長さ、少なくとも50残基の長さ、または核酸もしくはポリペプチドの完全長である。2つのポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、それぞれ、(1) 2つの配列間に類似した配列 (すなわち、その完全配列の一部) を含むことがあり、ならびに(2) 2つの配列間に互いに異なる配列をさらに含むことがあるので、2つ (またはそれ以上) のポリヌクレオチドまたはポリペプチド間の配列比較は、「比較ウィンドウ」に関して2つのポリヌクレオチドの配列を比較して局所的な配列類似性領域を特定し、比較することによって、代表的に行われる。

【0044】

一部の実施形態において、「参照配列」は、一次アミノ酸配列に基づく場合があり、この場合の参照配列は、その一次配列内に1つ以上の変更を有し得る配列である。例えば、「X190に対応する残基にプロリンを有する配列番号4に基づく」参照配列は、配列番号4のX190における対応する残基がプロリンに変更された参照配列を指す。

【0045】

「比較ウィンドウ」は、配列を少なくとも20の連続するヌクレオチドまたはアミノ酸の参照配列と比較することができ、且つ、その比較ウィンドウ内の配列の一部が、2つの配列の最適なアラインメントのために、(付加または欠失を含まない) 参照配列と比較して20パーセント以下の付加または欠失 (すなわち、ギャップ) を含むことがある、少なくとも約20の連続するヌクレオチド位置またはアミノ酸残基の概念上のセグメントを指す。比較ウィンドウは、20連続残基より長いことがあり、場合によっては、30、40、50、100、またはそれより長いウィンドウを含む。

【0046】

「実質的同一性」は、少なくとも20の残基位置の比較ウィンドウに関して、多くの場合、少なくとも30～50残基のウィンドウに関して参照配列を比較すると、少なくとも80パーセントの配列同一性、少なくとも85パーセントの同一性および89から95パ

10

20

30

40

50

ーセントの配列同一性、より普通には少なくとも 99 パーセントの配列同一性を有する、ポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列を指し、この場合の配列同一性百分率は、その比較ウィンドウに関して参照配列とその参照配列の総計 20 パーセント以下になる欠失または付加を含む配列とを比較することによって計算される。ポリペプチドに適用される特定の実施形態において、用語「実質的な同一性」は、デフォルトギャップ重みづけを用いてプログラム G A P または B E S T F I T などによって最適にアラインしたとき、2 つのポリペプチド配列が、少なくとも 80 パーセントの配列同一性、好ましくは、少なくとも 89 パーセントの配列同一性、少なくとも 95 パーセントの配列同一性またはそれ以上（例えば、99 パーセントの配列同一性）を共有することを意味する。好ましくは、同一でない残基位置は、保存的アミノ酸置換により異なる。

10

【0047】

所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列の番号付けに関連して用いるときの「に対応する」、「への参照」または「基準として」は、その所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列を参照配列と比較するときのその指定参照配列の残基の番号付けを指す。言い換えると、所与のポリマーの残基数または残基位置は、その所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列内の残基の実際の数値の位置によってではなく参照配列を基準にして指定される。例えば、所与のアミノ酸配列、例えば操作されたケトレダクターゼのもの、と参照配列とを、ギャップを導入してそれら 2 配列間の残基一致を最適化することによって、アラインすることができる。これらの場合では、ギャップは存在するが、アラインした参照配列を基準にしてその所与のアミノ酸またはポリヌクレオチド配列内の残基の番号付けを行う。

20

【0048】

「立体選択性」は、化学反応または酵素的反応における 1 つの立体異性体の別のものに勝る優先的形成を指す。立体選択性は、部分的である場合があり、この場合は 1 つの立体異性体の形成が他のものより有利であり、または完全であることもあり、この場合は 1 つだけの立体異性体が形成される。立体異性体がエナンチオマーであるとき、その立体選択性はエナンチオ選択性と呼ばれ、これは、一方のエナンチオマーの両方の合計中の分率である（代表的に、百分率として報告される）。それは、当該技術分野では、一般に、代替的に、式 $\frac{[\text{主エナンチオマー} - \text{副エナンチオマー}]}{[\text{主エナンチオマー} + \text{副エナンチオマー}]}$ に従ってそれから算出されるエナンチオマー過剰率（e . e .）として（代表的に、百分率として）報告される。これは、立体異性体過剰率（s . e .）と呼ばれる場合もある。立体異性体が、ジアステレオマーである場合、その立体選択性は、ジアステレオ選択性とも呼ばれ、これは、2 つのジアステレオマーの混合物中の 1 つのジアステレオマーの分率である（代表的に、百分率で報告される）。

30

【0049】

「高立体選択的」は、少なくとも約 85 % の立体異性体過剰率で 2' , 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノン（式（I））に対応する（S）- アルコール生成物の（S）- 1 - [2 , 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル] - エタノール（式（II））に変換または還元することができるケトレダクターゼポリペプチドを指す。

【0050】

「改善された酵素特性」は、参照ケトレダクターゼと比較して何らかの酵素特性の改善を示すケトレダクターゼポリペプチドを指す。本明細書に記載する操作されたケトレダクターゼポリペプチドについて、その比較は、一般に、野生型ケトレダクターゼ酵素に対して行われるが、一部の実施形態では、その参照ケトレダクターゼが、別の改善された操作されたケトレダクターゼである場合もある。改善が望ましい酵素特性としては、酵素活性（基質の変換パーセントによって表すことができる）、熱安定性、pH 活性プロファイル、補因子要件、阻害因子（例えば、生成物阻害）に対する不応性、立体特異性、および立体選択性（立体選択性を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。

40

【0051】

「増大された酵素活性」は、操作されたケトレダクターゼポリペプチドの改善された特

50

性を指し、参照ケトレダクターゼ酵素と比較して比活性（例えば生成される生成物／時間／タンパク質重量）の増加、または基質の生成物への変換パーセント（例えば、指定量の K R E D の使用による指定時間内の生成物への基質の発現量の変換パーセント）の増加がその代表であり得る。酵素活性を判定するための例示的方法是、実施例に提供する。 K_m 、 V_{max} または k_{cat} の古典的酵素特性を含めて、その変化が増加された酵素活性につながり得る酵素活性に関するいずれの特性も対象となり得る。酵素活性の改善は、対応する野生型ケトレダクターゼ酵素の酵素活性の約 1.5 倍から、2 倍ほどにもなる場合がある。天然由来のケトレダクターゼまたはそのケトレダクターゼポリペプチドが誘導された別の操作されたケトレダクターゼより 5 倍、10 倍、20 倍、25 倍、50 倍、75 倍、100 倍、またはそれより大きい酵素活性。特定の実施形態において、前記操作されたケトレダクターゼ酵素は、親ケトレダクターゼ酵素のものより 1.5 から 50 倍、1.5 から 100 倍大きい範囲の改善された酵素活性を示す。いずれの酵素の活性も、その触媒回転速度が基質（任意の必要補因子を含む）の拡散速度を超えることができないように、拡散制限されることは、当業者には理解される。その拡散限界、すなわち k_{cat} / K_m 、の理論的最大値は、一般に、約 10^8 から 10^9 ($M^{-1} s^{-1}$) である。それ故、ケトレダクターゼの酵素活性のいずれの改善も、そのケトレダクターゼ酵素による作用を受ける基質の拡散速度に関連した上限を有する。ケトレダクターゼ活性は、ケトレダクターゼを測定するために用いられる標準的なアッセイのいずれか 1 つ、例えば、その酸化とケトンのアルコールへの付随的還元起因する、N A D P H の吸光度もしくは蛍光の減少（実施例 5 参照）によって、または結合アッセイにおいて生成される生成物によって、測定することができる。酵素活性の比較は、本明細書中で詳細にさらに説明するような、酵素の規定された調製、設定条件下での規定されたアッセイ、および 1 つ以上の規定された基質を用いて行われる。一般に、溶解産物を比較するとき、宿主細胞によって生産されるおよび溶解産物中に存在する酵素の量の変化を最小にするために同一の発現系および同一の宿主細胞を使用するばかりでなく、アッセイする細胞の数およびタンパク質の量も決定する。

【0052】

「変換」は、基質の対応する生成物への酵素的還元を指す。「変換パーセント」は、ある期間内に指定条件下で生成物に還元される基質のパーセントを指す。従って、ケトレダクターゼポリペプチドの「酵素活性」または「活性」は、基質の生成物への「変換パーセント」として表すことができる。

【0053】

「熱安定性」は、ある期間（例えば、0.5 ~ 24 時間）、高温（例えば、40 ~ 80）への暴露後、未処理の酵素と比較して同様の活性（例えば、60 % から 80 % より多く）を維持するケトレダクターゼポリペプチドを指す。

【0054】

「溶媒安定性」は、ある期間（例えば、0.5 ~ 24 時間）、様々な濃度（例えば、5 ~ 99 %）の溶媒（例えば、イソプロピルアルコール、テトラヒドロフラン、2 - メチルテトラヒドロフラン、アセトン、トルエン、酢酸ブチル、メチル *tert* - ブチルエーテルなど）への暴露後、未処理の酵素と比較して同様の活性（例えば、60 % から 80 % より多く）を維持するケトレダクターゼポリペプチドを指す。

【0055】

「pH 安定性」は、ある期間（例えば、0.5 ~ 24 時間）、高いまたは低い pH（例えば、4.5 ~ 6 または 8 から 12）への暴露後、未処理の酵素と比較して同様の活性（例えば、60 % から 80 % より多く）を維持するケトレダクターゼポリペプチドを指す。

【0056】

「熱および溶媒安定性」は、熱安定性でもあり、溶媒安定性でもある、ケトレダクターゼポリペプチドを指す。

【0057】

操作されたケトレダクターゼ酵素に関連して本明細書において用いる場合の「から誘導

される」は、その操作の基礎になった、元のケトレダクターゼ酵素、および/またはそのようなケトレダクターゼ酵素をコードする遺伝子を特定する。例えば、配列番号38の操作されたケトレダクターゼ酵素は、配列番号4の *Lactobacillus kefir* ケトレダクターゼ酵素をコードする遺伝子を何世代にもわたって人工的に進化させることによって得られた。従って、この操作されたケトレダクターゼ酵素は、配列番号4の野生型ケトレダクターゼ「から誘導される」。

【0058】

「親水性アミノ酸または残基」は、Eisenbergら, 1984, *J. Mol. Biol.* 179: 125-142の正規化コンセンサス疎水性尺度に従ってゼロ未満の疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基を指す。遺伝子コード化された親水性アミノ酸としては、L-Thr (T)、L-Ser (S)、L-His (H)、L-Glu (E)、L-Asn (N)、L-Gln (Q)、L-Asp (D)、L-Lys (K) および L-Arg (R) が挙げられる。

10

【0059】

「酸性アミノ酸または残基」は、そのアミノ酸がペプチドまたはポリペプチドに含まれているときに約6未満のpK値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を指す。酸性アミノ酸は、ヒドロニウムイオン喪失のため、生理学的pHで負の電荷を有する側鎖を代表的に有する。遺伝子コード化された酸性アミノ酸としては、L-Glu (E) および L-Asp (D) が挙げられる。

【0060】

20

「塩基性アミノ酸または残基」は、そのアミノ酸がペプチドまたはポリペプチドに含まれているときに約6より大きいpK値を示す側鎖を有する親水性アミノ酸または残基を指す。塩基性アミノ酸は、水素イオンとの会合のため、生理学的pHで正の電荷を有する側鎖を代表的に有する。遺伝子コード化された塩基性アミノ酸としては、L-Arg (R) および L-Lys (K) が挙げられる。

【0061】

「極性アミノ酸または残基」は、生理学的pHで電荷を有さない側鎖を有するが、2個の原子によって共同で共有される電子対がそれらの原子のうちの1つによってより近くに保持される少なくとも1つの結合を有する、親水性アミノ酸または残基を指す。遺伝子コード化された極性アミノ酸としては、L-Asn (N)、L-Gln (Q)、L-Ser (S) および L-Thr (T) が挙げられる。

30

【0062】

「疎水性アミノ酸または残基」は、Eisenbergら, 1984, *J. Mol. Biol.* 179: 125-142の正規化コンセンサス疎水性尺度に従ってゼロより大きい疎水性を示す側鎖を有するアミノ酸または残基を指す。遺伝子コード化された疎水性アミノ酸としては、L-Pro (P)、L-Ile (I)、L-Phe (F)、L-Val (V)、L-Leu (L)、L-Trp (W)、L-Met (M)、L-Ala (A) および L-Tyr (Y) が挙げられる。

【0063】

「芳香族アミノ酸または残基」は、少なくとも1つの芳香族またはヘテロ芳香族環を含む側鎖を有する、親水性または疎水性アミノ酸または残基を指す。遺伝子コード化された芳香族アミノ酸としては、L-Phe (F)、L-Tyr (Y) および L-Trp (W) が挙げられる。そのヘテロ芳香族窒素原子のpKaのせいでL-His (H) は、時として、塩基性残基として分類され、またはその側鎖がヘテロ芳香族環を含むので芳香族残基として分類されるが、本明細書では、ヒスチジンを親水性残基として、または「拘束残基」(下記参照)として分類する。

40

【0064】

「拘束アミノ酸または残基」は、拘束された幾何学的配置を有する、アミノ酸または残基を指す。本明細書において、拘束残基としては、L-pro (P) および L-his (H) が挙げられる。ヒスチジンは、比較的小さいイミダゾール環を有するため、拘束され

50

た幾何学的配置を有する。プロリンは、これも5員環を有するため、拘束された幾何学的配置を有する。

【0065】

「非極性アミノ酸または残基」は、生理学的pHで電荷を有さない側鎖を有し、且つ、2個の原子によって共同で共有される電子対がそれら2個の原子それぞれによってほぼ同等に保持される結合を有する（すなわち、側鎖が非極性である）、疎水性アミノ酸または残基を指す。遺伝子コード化された非極性アミノ酸としては、L-Gly(G)、L-Leu(L)、L-Val(V)、L-Ile(I)、L-Met(M)およびL-Ala(A)が挙げられる。

【0066】

「脂肪族アミノ酸または残基」は、脂肪族炭化水素側鎖を有する、疎水性アミノ酸または残基を指す。遺伝子コード化された脂肪族アミノ酸としては、L-Ala(A)、L-Val(V)、L-Leu(L)およびL-Ile(I)が挙げられる。

【0067】

「システイン」。アミノ酸L-Cys(C)は、他のL-Cys(C)アミノ酸または他のスルファニル含有もしくはスルフヒドリル含有アミノ酸とジスルフィド架橋を形成することができる点で独特である。「システイン様残基」は、システイン、およびジスルフィド架橋の形成に利用できるスルフヒドリル部分を含有する他のアミノ酸を含む。L-Cys(C)（および-SH含有側鎖を有する他のアミノ酸）が、還元された遊離-SH形態または酸化されたジスルフィド架橋形態のいずれかでペプチド中に存在できることが、L-Cys(C)がペプチドに正味の疎水性をもたらすのか、親水性をもたらすのかに影響を及ぼす。L-Cys(C)は、Eisenbergの正規化コンセンサス尺度(Eisenbergら, 1984、上記文献)に従って0.29の疎水性を示すが、本発明の開示のために、L-Cys(C)がそれ独自の独特な群に類別されることは理解されるべきである。

【0068】

「小アミノ酸または残基」は、合計3個以下の炭素および/またはヘテロ原子（炭素および水素を除く）から構成される側鎖を有するアミノ酸または残基を指す。小アミノ酸または残基は、上の定義に従って、脂肪族、非極性、極性または酸性小アミノ酸または残基としてさらに類別することができる。遺伝子コード化された小アミノ酸としては、L-Ala(A)、L-Val(V)、L-Cys(C)、L-Asn(N)、L-Ser(S)、L-Thr(T)およびL-Asp(D)が挙げられる。

【0069】

「ヒドロキシル含有アミノ酸または残基」は、ヒドロキシル(-OH)部分を含有するアミノ酸を指す。遺伝子コード化されたヒドロキシル含有アミノ酸としては、L-Ser(S)、L-Thr(T)およびL-Tyr(Y)が挙げられる。

【0070】

「保存的」アミノ酸置換または突然変異は、類似した側鎖を有する残基の交換可能性を指し、従って、アミノ酸の同じまたは類似した規定されたクラスの中のアミノ酸でのポリペプチド内のアミノ酸の置換を代表的に含む。しかし、本明細書において用いる場合、一部の実施形態において、保存的突然変異は、その保存的突然変異が、代わりに、脂肪族残基から脂肪族残基、非極性残基から非極性残基、極性残基から極性残基、酸性残基から酸性残基、塩基性残基から塩基性残基、芳香族残基から芳香族残基、または拘束残基から拘束残基への置換であり得る場合、親水性残基から親水性残基、疎水性残基から疎水性残基、ヒドロキシル含有残基からヒドロキシル含有残基、または小残基から小残基への置換を含まない。さらに、本明細書において用いる場合、A、V、L、またはIは、別の脂肪族残基または別の非極性残基のいずれかに保存的に突然変異させることができる。下の表は、例示的保存的置換を示すものである。

【0071】

【表 1】

表1: 保存的置換

残基	可能な保存的突然変異
A、L、V、I	他の脂肪族(A、L、V、I) 他の非極性(A、L、V、I、G、M)
G、M	他の非極性(A、L、V、I、G、M)
D、E	他の酸性(D、E)
K、R	他の塩基性(K、R)
P、H	他の拘束(P、H)
N、Q、S、T	他の極性
Y、W、F	他の芳香族(Y、W、F)
C	なし

10

「非保存的置換」は、有意に異なる側鎖特性を有するアミノ酸でのポリペプチド内のアミノ酸の置換または突然変異を指す。非保存的置換は、上に列挙した規定された群内ではなく、群間でのアミノ酸を用いるものであり得る。1つの実施形態において、非保存的突然変異は、(a)置換領域内のペプチド骨格の構造(例えば、グリシンの代わりにプロリン)(b)電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖の嵩に影響を及ぼす。

20

【0072】

「欠失」は、参照ポリペプチドからの1つ以上のアミノ酸の除去によるポリペプチドへの修飾を指す。アミノ酸配列における欠失は、操作されたケトレダクターゼ酵素の酵素活性を維持しながらおよび/または改善された特性を維持しながらの、その参照酵素を構成する1つ以上のアミノ酸、2つ以上のアミノ酸、3つ以上のアミノ酸、4つ以上のアミノ酸、5つ以上のアミノ酸、6つ以上のアミノ酸、8つ以上のアミノ酸、10以上のアミノ酸、15以上のアミノ酸、または20以上のアミノ酸、総アミノ酸数の10%以下、総アミノ酸数の15%以下、または総アミノ酸数の20%以下の除去を含むことができる。欠失は、ポリペプチドの内部に関する場合があり、および/または末端部分に関する場合がある。様々な実施形態において、欠失は、連続セグメントを含み得、または非連続的である場合がある。

30

【0073】

「挿入」は、参照ポリペプチドからの、1つ以上のアミノ酸の付加によるポリペプチドへの修飾を指す。一部の実施形態において、前記改善された操作されたケトレダクターゼ酵素は、天然由来のケトレダクターゼポリペプチドへの1つ以上のアミノ酸の挿入、ならびに他の改善されたケトレダクターゼポリペプチドへの1つ以上のアミノ酸の挿入を含む。挿入は、ポリペプチドの内部でのものである場合があり、またはカルボキシもしくはアミノ末端へのものである場合がある。本明細書において用いる場合の挿入物は、当該技術分野において公知であるような融合タンパク質を含む。前記挿入物は、アミノ酸の連続セグメントである場合があり、または天然由来ポリペプチド内での1つ以上のアミノ酸によって隔てられている場合がある。

40

【0074】

本明細書中で用いられる「フラグメント」は、アミノ末端および/またはカルボキシ末端の欠失を有するが、残りのアミノ酸配列はその配列の対応する位置と同じである、ポリペプチドを指す。フラグメントは、少なくとも14アミノ酸長、少なくとも20アミノ酸長、少なくとも50アミノ酸長またはそれ以上で、配列番号2または配列番号4の完全長の天然に存在するケトレダクターゼポリペプチドの70%、80%、90%、95%、98%および99%までであり得る。

【0075】

「単離されたポリペプチド」は、本来それに随伴する他の不純物、例えばタンパク質、

50

脂質およびポリヌクレオチド、から実質的に分離されているポリペプチドを指す。この用語は、それらの自然発生環境または発現系（例えば、宿主細胞またはインビトロ合成）から除去または精製されたポリペプチドを包含する。前記改善されたケトレダクターゼ酵素は、細胞内に存在することもあり、細胞の培地中に存在することもあり、または溶解産物もしくは単離された製剤などの様々な形態で調製することができる。従って、一部の実施形態において、前記改善されたケトレダクターゼ酵素は、単離されたポリペプチドであり得る。

【0076】

「実質的に純粋なポリペプチド」は、そのポリペプチド種が、存在する優勢な種である（すなわち、molまたは重量ベースで、それがその組成物中のいずれの他の個々の高分子種よりも豊富である）組成物を指し、一般に、対象種がmolまたは重量%でその存在する高分子種の少なくとも約50パーセントを構成する場合には実質的に精製されている組成物である。一般に、実質的に純粋なケトレダクターゼ組成物は、その組成物中に存在するすべての高分子種のmolまたは重量%で約60%以上、約70%以上、約80%以上、約90%以上、約95%以上、および約98%以上を構成する。一部の実施形態において、対象種は、その組成物が単一の高分子種から本質的に成る、本質的均質（すなわち、従来の検出方法によってその組成物中で汚染種を検出できない）へと精製される。溶媒種、小分子（<500ダルトン）、および元素イオン種は、高分子種とはみなされない。一部の実施形態において、単離された改善されたケトレダクターゼポリペプチドは、実質的に純粋なポリペプチド組成物である。

【0077】

「ストリンジェントハイブリダイゼーション」は、核酸ハイブリッドが安定している条件を指すために本明細書では用いる。当業者には公知であるように、ハイブリッドの安定性は、そのハイブリッドの融解温度（ T_m ）に反映される。一般に、ハイブリッドの安定性は、イオン強度、温度、G/C含有率、およびカオトロピック剤の存在の関数である。ポリヌクレオチドの T_m 値は、融解温度の公知予測方法を用いて計算することができる（例えば、Baldinoら, *Methods Enzymology* 168:761-777; Boltonら, 1962, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48:1390; Bresslauerら, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8893-8897; Freierら, 1986, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9373-9377; Kierzekら, *Biochemistry* 25:7840-7846; Rychlikら, 1990, *Nucleic Acids Res* 18:6409-6412 (erratum, 1991, *Nucleic Acids Res* 19:698); Sambrookら, 上記文献; Suggsら, 1981, *In Developmental Biology Using Purified Genes* (Brownら編), pp. 683-693, Academic Press; および Wetmur, 1991, *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26:227-259 参照)。すべての出版物は、参照により本明細書に援用されている。一部の実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に開示するポリペプチドをコードし、ならびに規定された条件下、例えば中ストリンジェントまたは高ストリンジェント条件下で、本開示の操作されたケトレダクターゼ酵素をコードする配列の補体にハイブリダイズする。

【0078】

「ハイブリダイゼーションストリンジェンシー」は、核酸のハイブリダイゼーションにおけるハイブリダイゼーション条件、例えば洗浄条件に関する。一般に、ハイブリダイゼーション反応は、より低いストリンジェンシーの条件下で行われ、その後、様々だがより高いストリンジェンシーの洗浄が行われる。用語「中ストリンジェントハイブリダイゼーション」は、標的DNAが、その標的DNAとの約60%の同一性、好ましくは約75%の同一性、約85%の同一性と、標的ポリヌクレオチドとの約90%より高い同一性とを有する相補的核酸に結合できる条件を指す。例示的中ストリンジェント条件は、50%ホ

ルムアミド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2% SDS中、42℃でのハイブリダイゼーション、その後、0.2×SSPE、0.2% SDS中、42℃での洗浄に相当する条件である。「高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション」は、規定されたポリヌクレオチド配列についての溶解条件のもとで決定されるような熱融解温度 T_m から約10℃またはそれより低い条件を一般に指す。一部の実施形態において、高ストリンジェンシー条件は、0.018M NaCl中、65℃で安定なハイブリッドを形成する核酸配列のみのハイブリダイゼーションを可能にする条件を指す。(すなわち、ハイブリッドが0.018M NaCl中、65℃で不安定な場合、それは、ここで考えられる場合には高ストリンジェンシー条件下で不安定である)。高ストリンジェンシー条件は、例えば、50%ホルムアルデヒド、5×デンハルト溶液、5×SSPE、0.2% SDS中、42℃でのハイブリダイゼーション、その後、0.1×SSPE、および0.1% SDS中、65℃での洗浄に相当する条件によって規定され得る。別の高ストリンジェンシー条件は、0.1%(w:v) SDSを含有する5×SSC中、65℃でのハイブリダイゼーション、および0.1% SDSを含有する0.1×SSC中、65℃での洗浄に相当する条件でのハイブリダイゼーションである。他の高ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件、ならびに中ストリンジェント条件は、上で引用した参考文献に記載されている。

【0079】

「異種」ポリヌクレオチドは、実験技術によって宿主細胞に導入される任意のポリヌクレオチドを指し、および宿主細胞から除去され、実験操作に付され、その後、宿主細胞に再び導入されるポリヌクレオチドを含む。

【0080】

「コドン最適化される」は、そのコードされたタンパク質がその対象生物において効率的に発現されるように、タンパク質をコードするポリヌクレオチドのコドン特定の生物において優先的に用いられるものに変更することを指す。遺伝子コードは、大部分のアミノ酸が、「シノニム」または「同義」コドンと呼ばれる幾つかのコドンによって表される点で縮重しているが、特定の生物によるコドン使用頻度が無作為でなく、特定のコードトリプレット偏ることは周知である。このコドン使用頻度の偏りは、所定の遺伝子、共通の機能または先祖起源の遺伝子、低コピー数タンパク質に対して高度に発現されるタンパク質、および生物のゲノムの総タンパク質コーディング領域に関して、より高いことがある。一部の実施形態において、ケトレダクターゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを、発現のために選択される宿主生物からの最適な生産のためにコドン最適化することができる。

【0081】

「好ましい、最適な、大いにコドン使用頻度に偏りのあるコドン」は、同義で、タンパク質コーディング領域内の同じアミノ酸をコードする他のコドンより高い頻度で使用されるコドン、を指す。単一の遺伝子のコドン使用頻度、共通の機能または起源の遺伝子のセット、高度に発現される遺伝子、生物全体の総タンパク質コーディング領域におけるコドン頻度、関連生物の総タンパク質コード領域におけるコドン頻度、またはそれらの組み合わせに関して、好ましいコドンを決することができる。遺伝子発現レベルに伴って頻度が増加するコドンは、代表的に、発現に最適なコドンである。例えばクラスター分析または応答分析を用いる、多変量解析をはじめとする、特定の生物におけるコドン頻度(例えば、コドン使用頻度、相対同義コドン使用頻度)およびコドン選好性を判定するための様々な方法、ならびに遺伝子において使用されるコドンの有効数を決定するための様々な方法が公知である(GCG Codon Preference, Genetics Computer Group Wisconsin Package; CodonW, John Peden, University of Nottingham; McInerney, J. O., 1998, Bioinformatics 14:372-73; Stenicoら, 1994, Nucleic Acids Res. 22:2437-46; Wright, F., 1990, Gene 87:23-29参照)。コドン使用頻度表は

、増えつつある生物リストに利用できる（例えば、Wadaら, 1992, *Nucleic Acids Res.* 20:2111-2118; Nakamuraら, 2000, *Nucl. Acids Res.* 28:292; Duretら, 上記文献; Henaut および Danchin, 「*Escherichia coli* and *Salmonella*」, 1996, Neidhardtら編, ASM Press, Washington D.C., p. 2047-2066 参照）。コドン使用頻度を得るためのデータ源は、タンパク質をコードすることができる任意の利用可能なヌクレオチド配列に依存し得る。これらのデータセットは、発現されるタンパク質をコードすることが実際に知られている核酸配列（例えば、完全タンパク質コーディング配列 - CDS）、発現される配列タグ（ESTS）、またはゲノム配列の予測コーディング領域を含む（例えば、Mount, D., *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, 第8章, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001; Ueberbacher, E.C., 1996, *Methods Enzymol.* 266:259-281; Tiwarilら, 1997, *Comput. Appl. Biosci.* 13:263-270 参照）。

10

【0082】

「制御配列」は本明細書で、対象のポリヌクレオチドおよび/またはポリペプチドの発現に必要なまたは好都合であるすべての成分を含むとして定義される。各制御配列は、未変性であり得るか、またはポリペプチドをコードする核酸配列にとって外来性であり得る。このような制御配列は、これに限定されるわけではないが、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモータ、シグナルペプチド配列、および転写ターミネータを含む。制御配列は最低限、プロモータ、ならびに転写および翻訳停止シグナルを含む。制御配列には、制御配列と対象のポリヌクレオチド、例えば、ポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域との結合を促進する特異的制限部位を導入する目的で、リンカーが提供され得る。

20

【0083】

「操作可能に連結された」は本明細書で、制御配列がポリヌクレオチドおよび/またはポリヌクレオチドによってコードされたポリペプチドの発現を指示するように、制御配列がポリヌクレオチド配列に対する位置に（すなわち機能的関係で）適切に配置された立体配置として定義される。

30

【0084】

「プロモータ配列」は、ポリヌクレオチドの発現のために宿主細胞によって認識される核酸配列である。制御配列は、適切なプロモータ配列を含むことができる。プロモータ配列は、ポリヌクレオチドの発現を媒介する転写制御配列を含有する。プロモータは、ミュータント、切断、およびハイブリッドプロモータを含む最適な宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列であり、宿主細胞に対して相同または非相同のどちらかである細胞外または細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られる可能性がある。

【0085】

40

ケトレダクターゼ酵素

本開示は、所定のケト基質をその対応するアルコール生成物に立体選択的に還元することと、L.kefir（配列番号2）もしくはL.breviis（配列番号4）もしくはL.minor（配列番号98）より得た天然に存在する野生型KRED酵素と比較したとき、または他の改変ケトレダクターゼ酵素と比較したとき、改良された特性を有することが可能である、改変ケトレダクターゼ（「KRED」）酵素を提供する。本開示で示すように、野生型L.kefirまたはL.breviisまたはL.minorケトレダクターゼ酵素は、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンの還元について、持っているとしても、非常に低い活性しか持っていない（実施例を参照）。野生型酵素がより高い活性を有するあまり置換されていないアセトフェノン基質では、野生型酵素は

50

、アセトフェノンのその対応する(R)-アルコールへの還元について一般に選択的である。野生型 *Lactobacillus* 種ケトレダクターゼは、原型の参照化合物アセトフェノンを(R)-1-フェネタノールに還元して、その結果として(R)-選択性ケトレダクターゼ、すなわち(R)-ケトレダクターゼと呼ばれる。しかし、野生型 *Lactobacillus* 種ケトレダクターゼ酵素に由来する本開示の改変レダクターゼ酵素は、アセトフェノンを(S)-1-フェネタノールに還元して、その結果として(S)-選択性ケトレダクターゼ、すなわち(S)-ケトレダクターゼと呼ばれる。それゆえ、本開示の改良されたケトレダクターゼポリペプチドは、野生型 *L. kefir* または *L. brevis* または *L. minor* ケトレダクターゼと比較して、アセトフェノンの還元の逆のエナンチオ選択性が可能である。この逆のエナンチオ選択性は、野生型酵素の190位の残基を好ましくは非芳香族残基に、特にプロリン残基に変異させることに基づいている。理論に縛られることなく、190位の野生型チロシン残基は、プロ-S配座にて基質と衝突するように思われる。それゆえ、いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2または4または98の190位に対応する残基にチロシンでない残基を有する。好ましくは、この残基は非芳香族残基、例えば、脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基である。いくつかの実施形態において、本残基はプロリンである。

【0086】

いくつかの実施形態において、上記のように、改良された酵素特性を備えた改変ケトレダクターゼは、配列番号4の *Lactobacillus kefir* ケトレダクターゼまたは配列番号2の *Lactobacillus brevis* ケトレダクターゼまたは配列番号98の *Lactobacillus minor* ケトレダクターゼに関して記載される。アミノ残基位置は、開始メチオニン(M)残基から開始してケトレダクターゼにおいて決定されるが(すなわち、Mは残基位置1を表す)、この開始メチオニン残基は宿主細胞またはインビトロ翻訳系におけるように生物処理機構によって除去されて、開始メチオニン残基のない成熟タンパク質を産生し得ることが当業者によって理解される。特定のアミノ酸またはアミノ酸変化がアミノ酸配列中に存在するアミノ酸残基位置は、「X_n」、または「n位」という用語によって本明細書に時々記載され、ここでnは残基位置を指す。ケトレダクターゼの間で同じ残基位置のアミノ酸残基が異なる場合、異なる残基は「/」によって示されることがあり、配置は「*kefir* 残基/*brevis* 残基/*minor*」である。参照配列、例えば、配列番号2および配列番号4および配列番号98の野生型ケトレダクターゼにおけるアミノ酸残基の異なるアミノ酸残基との交換である置換変異は、記号「」によって示され得る。本明細書では、変異は、ある種のアミノ酸「ヘ(t o a)」の変異として時々記載される。例えば、配列番号2の残基16は極性残基「ヘ」変異させることができる。しかし、「ヘ」という句の使用は、あるクラスの1つのアミノ酸から同じクラスの別のアミノ酸への変異を除外しない。例えば、配列番号2の残基16は極性残基トレオニンであるが、トレオニンは異なる極性残基に変異させることができ、例えば、変異は「T16S」(16 S)変異であり得る。

【0087】

Lactobacillus kefir、*Lactobacillus brevis*、または *Lactobacillus minor* の天然に存在するケトレダクターゼ(「ADH」または「アルコールデヒドロゲナーゼ」とも呼ばれる)をコードする天然に存在するポリヌクレオチドは、ケトレダクターゼ活性をコードすることが公知の単離ポリヌクレオチド(例えば *Lactobacillus kefir* では、Genbankアクセッション番号AAP94029 GI:33112056または配列番号3; *Lactobacillus brevis* では、Genbankアクセッション番号CAD66648 GI:28400789または配列番号:1および *Lactobacillus minor* では配列番号97)から得ることができる。

【0088】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドの(野生型または別の改

10

20

30

40

50

変ポリペプチドと比較して)改良された特性は、式(III)の置換アセトフェノン基質を式(IV)のその対応する(S)-アルコール生成物に還元または変換するためのその立体選択性の上昇に関する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼ特性の改良された特性は、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エタノールに還元する立体選択性の上昇に関する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドの改良された特性は、基質の生成物へのその変換率の上昇に関する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドの改良された特性は、その安定性または熱安定性に関する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは2つ以上の改良された特性を有する。

10

【0089】

いくつかの実施形態において、本明細書のケトレダクターゼポリペプチドは、ケトレダクターゼ特性の改良を生じさせるために、参照配列(例えば、天然に存在するポリペプチドまたは改変ポリペプチド)に対するいくつかの修飾を有することができる。本明細書で使用するように、「修飾」はアミノ酸の置換、欠失、および挿入を含む。任意の1つの修飾または修飾の組み合わせを天然に存在するまたは改変ポリペプチドに導入して、改変酵素を産生することができる。このような実施形態において、アミノ酸配列に対する修飾の数は、参照ポリペプチド配列の、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、6個以上のアミノ酸、8個以上のアミノ酸、10個以上のアミノ酸、15個以上のアミノ酸、または20個以上のアミノ酸、アミノ酸の総数の10%まで、アミノ酸の総数の15%まで、アミノ酸の総数の20%まで、またはアミノ酸の総数の30%を含むことができる。いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼ特性を生じる天然に存在するポリペプチドまたは改変ポリペプチドに対する修飾の数は、参照配列の約1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、修飾の数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個のアミノ酸残基であり得る。修飾は、挿入、欠失、置換、またはその組み合わせを含むことができる。

20

30

【0090】

いくつかの実施形態において、修飾は参照配列に対するアミノ酸置換を含む。改良されたケトレダクターゼ特性を生じる置換は、参照酵素配列の、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、6個以上のアミノ酸、8個以上のアミノ酸、10個以上のアミノ酸、15個以上のアミノ酸、または20個以上のアミノ酸、アミノ酸の総数の10%まで、アミノ酸の総数の20%まで、またはアミノ酸の総数の30%までであり得る。いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼ特性を生じる天然に存在するポリペプチドまたは改変ポリペプチドに対する置換の数は、参照配列の約1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個のアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、置換の数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個のアミノ酸残基であり得る。

40

【0091】

いくつかの実施形態において、本明細書のケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基に非芳香族残基(例えば、脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基)、好ましくはアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリン、特にプロリンを有する、配列番号2、4または98に基づく参照配列と少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96

50

%、97%、98%、99%またはそれ以上同一であるアミノ酸配列を含むが、但し、そのケトレダクターゼポリペプチドがX190に対応する残基にチロシン以外、特に非芳香族残基である残基を有することを条件とする。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基が脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基であるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼは、X190に対応する残基がアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリン、特にプロリンであるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、これらのケトレダクターゼポリペプチドは、参照アミノ酸配列と比較して他の残基位置に1つ以上の残基相違を有することができる。この相違は、置換、欠失、および挿入などの各種の修飾を含む。置換は、非保存的置換、保存的置換、または非保存的および保存的置換の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態において、これらのケトレダクターゼポリペプチドは、参照配列と比較して他のアミノ酸残基に約1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の残基相違を場合により有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、参照配列と比較して他のアミノ酸残基における1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。

【0092】

いくつかの実施形態において、これらの立体選択性または高立体選択性（本明細書では、少なくとも約85%のエナンチオマー過剰率で基質を生成物に変換することができる）ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号95、96および119に配列したような配列式、または残基90~211などのその領域もしくはドメインに対応するアミノ酸配列を含む。配列番号95は、*Lactobacillus brevis* ケトレダクターゼの野生型アミノ酸配列（配列番号2）に基づき；配列番号96は、*Lactobacillus kefir* ケトレダクターゼの野生型アミノ酸配列（配列番号4）に基づき；および配列番号119は、*Lactobacillus minor* ケトレダクターゼの野生型アミノ酸配列（配列番号98）に基づく。>配列番号95、96、または119の配列式に基づくケトレダクターゼは、X190に対応する配列が非芳香族残基であることを規定する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基がアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンであるアミノ酸配列を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190に対応する残基がプロリンであるアミノ酸配列を有する。

【0093】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するような残基X190について規定された特徴を有する、配列番号95、96、または119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含むケトレダクターゼポリペプチドは、次のもの：X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、酸性または塩基性残基である；X16に対応する残基が、極性残基である；X43に対応する残基が、非極性または極性残基である；X60に対応する残基が、芳香族、非極性、または脂肪族残基である；X94に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基である；X95に対応する残基が、非極性または脂肪族残基である；X96に対応する残基が、極性または酸性残基である；X97に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基である；X120に対応する残基が、芳香族、非極性または脂肪族残基である；X125に対応する残基が、極性または非極性残基である；X142に対応する残基が、極性残基である；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；X149に対応する残基が、非極性または芳香族残基である；X150に対応する残基が、拘束されたまたは酸性残基である；X152に対応する残基が、非極性または極性残基である；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；X202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である；X205に対応する残

基が、塩基性、非極性または脂肪族残基である；およびX 2 0 6に対応する残基が、非極性または芳香族残基である、から選択される1つ以上の特徴をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列は、2、3、4、5、6つ以上の特徴を有することができる。いくつかの実施形態において、配列番号95、96、または119で与えられる配列式（またはその領域）に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して変異されるXによって規定されない1つ以上の残基をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、変異は、上でXによって定義されない他のアミノ酸残基における約1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の変異からであり得る。いくつかの実施形態において、変異の数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の他のアミノ酸残基であり得る。いくつかの実施形態において、変異は保存的変異を含む。

【0094】

いくつかの実施形態において、配列番号95、96、または119の配列式、またはその領域、例えば、残基90～211に基づくアミノ酸配列を含むポリペプチドは、配列番号2、4または98のアミノ酸配列と比較して1つ以上の保存的変異を有することができる。例示的な保存的変異は、これに限定されるわけではないが：X 1 6トレオニン（T）に対応する残基の、別の極性残基、例えば、アスパラギン、グルタミン、またはセリンによる置換；X 4 3バリンに対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、イソロイシンによる置換；X 6 0に対応する残基の、脂肪族または芳香族残基、例えば、アラニンによる置換；X 9 4アラニン（A）に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、バリン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換；X 9 5バリン（V）に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、アラニン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換；X 9 6セリン（S）に対応する残基の、別の極性残基、例えば、アスパラギン、グルタミン、またはトレオニンによる置換；X 1 4 2セリン（S）に対応する残基の、別の極性残基、例えば、セリンまたはアスパラギンによる置換；X 1 9 6バリン（V）に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、アラニン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換；およびX 2 0 5アラニン（A）に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、バリン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換などのアミノ酸置換を含む。

【0095】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するような残基X 1 9 0について規定された特徴を有する、配列番号95、96、または119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含むケトレダクターゼポリペプチドは、次のもの：X 7に対応する残基が、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、プロリン、ヒスチジン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン、特にグリシン、ヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、またはアスパラギンである；X 1 6に対応する残基が、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にセリンである；X 4 3に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にイソロイシンである；X 6 0に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアラニンである；X 9 4に対応する残基が、システイン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアラニン、バリンまたはシステインである；X 9 5に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、特にイソロイシンまたはロイシンである；X 9 6に対応する残基が、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にセリン、アスパラギン

ン、トレオニンまたはグルタミン酸である；X 97に対応する残基が、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、リジンまたはアルギニン、特にリジン、トレオニン、バリン、アルギニン、メチオニン、またはイソロイシンである；X 120に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にフェニルアラニンまたはバリンである；X 125に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にグリシンまたはセリンである；X 142に対応する残基が、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン残基、特にアスパラギンである；X 147に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、またはグルタミンである；X 149に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、またはトリプトファン、特にグリシンまたはフェニルアラニンである；X 150に対応する残基が、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸、特にアスパラギン酸またはヒスチジンである；X 152に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にセリン、トレオニン、またはメチオニンである；X 196に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にバリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；X 202に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアラニン、トリプトファン、チロシン、またはメチオニンである；X 205に対応する残基が、リジン、アルギニン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアルギニンである；およびX 206に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、特にメチオニンまたはチロシンである、から選択される1つ以上の特徴をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、アミノ酸配列は、2、3、4、5、6つ以上の特徴を有することができる。いくつかの実施形態において、配列番号95、96、または119で与えられる配列式（またはその領域）に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して変異されるXによって指定されない1つ以上の残基をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、変異は、上でXによって定義されない他のアミノ酸残基における約1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の変異からであり得る。いくつかの実施形態において、変異の数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の他のアミノ酸残基であり得る。いくつかの実施形態において、変異は保存的変異を含む。

【0096】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するようなX 190に対応する残基に特徴を有する、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含む立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、次の特徴：X 147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである、およびX 202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、の1つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7

10

20

30

40

50

、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

10

【0097】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に特徴を有する、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含む立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、次の特徴：X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基、特にヒスチジン、トリプトファン、プロリン、トレオニン、またはアルギニンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである；およびX202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、の1つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

20

30

【0098】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に特徴を有する、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含む立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、次の特徴：X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基、特にヒスチジン、トリプトファン、プロリン、トレオニン、またはアルギニンである；X97に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基、特にメチオニン、バリン、イソロイシン、トレオニン、またはアルギニンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである；X202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、の1つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3

40

50

、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0099】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に特徴を有する、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含む立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、次の特徴：X94に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基、特にシステインまたはバリンである；X96に対応する残基が、極性または酸性残基、特にトレオニンである；およびX147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである、の1つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0100】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に特徴を有する、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含む立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、次の特徴：X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基、特にヒスチジン、トリプトファン、プロリン、トレオニン、またはアルギニンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基、特にバリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；およびX202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、の1つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～26、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも8

10

20

30

40

50

５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する。

【０１０１】

いくつかの実施形態において、立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、本明細書に記載するようなＸ１９０に対応する残基に特徴を有する、配列番号９５、９６、もしくは１１９の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基９０～２１１を含み、次の特徴：Ｘ１４７に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである；Ｘ１９６に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基、特にバリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；およびＸ２０２に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である、の１つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号２、４または９８の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５または約１～４０個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５または約４０個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号２、４または９８に基づく参照配列に少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する。

【０１０２】

いくつかの実施形態において、立体選択性ケトレダクターゼポリペプチドは、本明細書に記載するようなＸ１９０に対応する残基に特徴を有する、配列番号９５、９６、もしくは１１９の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基９０～２１１を含み、次の特徴：Ｘ７に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基、特にヒスチジン、トリプトファン、プロリン、トレオニン、またはアルギニンである；Ｘ９６に対応する残基が、極性または酸性残基、特にトレオニンである；Ｘ１４７に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである；Ｘ１９６に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基、特にバリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；およびＸ２０２に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、の１つ以上または少なくともすべてをさらに有することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号２、４または９８の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５または約１～４０個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５または約４０個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号２、４または９８に基づく参照配列に関して少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する。

【０１０３】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トリプトファン、プロリン、トレオニン、またはアルギニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

10

【0104】

20

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X16 に対応する残基が、極性残基、特にセリンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

30

【0105】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X43 に対応する残基が、非極性または脂肪族残基、特にイソロイシンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の

40

50

残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

【0106】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X60 に対応する残基が、芳香族、非極性または脂肪族残基、特にアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

【0107】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X94 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基、特にシステインまたはバリンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

【0108】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X95 に対応する残基が、非極性または脂肪族残基、特にロイシンまたはイソロイシンである

、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

10

【0109】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X96 に対応する残基が、極性または酸性残基、特にトレオニンまたはグルタミン酸である、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

20

30

【0110】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X97 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基、特にメチオニン、バリン、イソロイシン、トレオニン、またはアルギニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、

40

50

９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する。

【０１１１】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号９５、９６、もしくは１１９の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基９０～２１１を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：Ｘ１９０に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびＸ１２０に対応する残基が、芳香族、非極性または脂肪族残基、特にバリンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号２、４または９８の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５または約１～４０個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５または約４０個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号２、４または９８に基づく参照配列に少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する。

10

20

【０１１２】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号９５、９６、もしくは１１９の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基９０～２１１を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：Ｘ１９０に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびＸ１２５に対応する残基が、極性または非極性残基、特にセリンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号２、４または９８の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５または約１～４０個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１４、１５、１６、１８、２０、２２、２４、２６、３０、３５または約４０個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号２、４または９８に基づく参照配列に少なくとも８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％、または９９％の同一性を有する。

30

【０１１３】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号９５、９６、もしくは１１９の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基９０～２１１を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：Ｘ１９０に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびＸ１４２に対応する残基が、極性残基、特にアスパラギンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号２、４または９８の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に１～２、１～３、１～４、１～５、１～６、１～７、１～８、１～９、１～１０、１～１１、１～１２、１～１４、１～１５、１～１６、１～１８、１～２０、１～２２、１～２４、１～２６、１～３０、１～３５または約１～４０個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他の

40

50

アミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0114】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびX147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシンまたはイソロイシンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0115】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびX149に対応する残基が、非極性または芳香族残基、特にフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0116】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびX1

50に対応する残基が、拘束されたまたは酸性残基、特にヒスチジンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

10

【0117】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびX152に対応する残基が、非極性または極性残基、特にメチオニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

20

30

【0118】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびX196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~26、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少な

40

50

くとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0119】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシンまたはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

10

20

【0120】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X205 に対応する残基が、塩基性、非極性または脂肪族残基、特にアルギニンまたはバリンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

30

40

【0121】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、および X206 に対応する残基が、非極性または芳香族残基、特にチロシンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 26、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1

50

～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0122】

10

いくつかの実施形態において、本開示の改良されたケトレダクターゼポリペプチドは、下の表2に挙げた変異のセットのいずれか1つを有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有し、ケトレダクターゼポリペプチドアミノ酸配列は、表2に挙げた置換組み合わせのセットのいずれか1つを含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、参照配列と比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～25、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。

20

【0123】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94から選択されるアミノ酸配列を含む。

30

【0124】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである、およびX196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号8、10、14、16、24、26または48などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～25、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダク

40

50

ーゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 8、10、14、16、24、26 または 48）を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0125】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X125 に対応する残基が、極性または非極性残基、特にセリンである；および X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 52 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 52）を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0126】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X95 に対応する残基が、非極性または脂肪族残基、特にロイシンまたはイソロイシンである；および X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 20、62、または 64 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 20、62、または 64）を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0127】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 2

10

20

30

40

50

11を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；およびX206に対応する残基が、非極性または芳香族残基、特にチロシンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号36などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号36）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0128】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トリプトファン、プロリン、トレオニン、またはアルギニンである；およびX196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号54または56などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号54または56）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0129】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；およびX196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号22、66、68または72などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参

10

20

30

40

50

照配列と比較して他の残基位置に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～25、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号22、66、68または72）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

10

【0130】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；およびX202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号28、30、または32などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～25、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号28、30、または32）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

20

30

【0131】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90～211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X152に対応する残基が、非極性または極性残基、特にメチオニンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；およびX205に対応する残基が、塩基性、非極性または脂肪族残基、特にアルギニンまたはバリンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号20などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、1～20、1～22、1～24、1～25、1～30、1～35または約1～40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35また

40

50

は約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号20）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0132】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X43に対応する残基が、非極性または脂肪族残基、特にイソロイシンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；およびX196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号70などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号70）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0133】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X94に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基、特にシステインまたはバリンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；およびX205に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号34などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号34）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を

10

20

30

40

50

有する。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 9 5、9 6、もしくは 1 1 9 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 9 0 ~ 2 1 1 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X 1 9 0 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X 9 7 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族または塩基性残基、特にアルギニン、バリン、メチオニン、トレオニンまたはイソロイシンである；X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；および X 1 9 6 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 7 4 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 9 8 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 1 0、1 ~ 1 1、1 ~ 1 2、1 ~ 1 4、1 ~ 1 5、1 ~ 1 6、1 ~ 1 8、1 ~ 2 0、1 ~ 2 2、1 ~ 2 4、1 ~ 2 5、1 ~ 3 0、1 ~ 3 5 または約 1 ~ 4 0 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 4、1 5、1 6、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、3 0、3 5 または約 4 0 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 7 4）を備えた配列番号 2、4 または 9 8 に基づく参照配列に少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する。

【 0 1 3 5 】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 9 5、9 6、もしくは 1 1 9 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 9 0 ~ 2 1 1 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X 1 9 0 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X 7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、またはアルギニンである；X 1 4 7 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X 1 9 6 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；および X 2 0 2 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 4 0、7 6、7 8、8 0、または 8 2 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 9 8 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 1 0、1 ~ 1 1、1 ~ 1 2、1 ~ 1 4、1 ~ 1 5、1 ~ 1 6、1 ~ 1 8、1 ~ 2 0、1 ~ 2 2、1 ~ 2 4、1 ~ 2 5、1 ~ 3 0、1 ~ 3 5 または約 1 ~ 4 0 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、1 0、1 1、1 2、1 4、1 5、1 6、1 8、2 0、2 2、2 4、2 6、3 0、3 5 または約 4 0 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 4 0、7 6、7 8、8 0、または 8 2）を備えた配列番号 2、4 または 9 8 に基づく参照配列に少なくとも 8 5 %、8 6 %、8 7 %、8 8 %、8 9 %、9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % の同一性を有する。

【 0 1 3 6 】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、またはアルギニンである；X94 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基、特にシステインまたはバリンである；X147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；および X202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 42 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 42）を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0137】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、またはアルギニンである；X94 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基、特にシステインまたはバリンである；X147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X149 に対応する残基が、非極性または芳香族残基、特にフェニルアラニンである；X150 に対応する残基が、拘束または酸性残基、特にヒスチジンである；X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；および X202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 84 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 84）を備えた配列番号 2、4 または

10

20

30

40

50

98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0138】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、またはアルギニンである；X96に対応する残基が、極性または酸性残基、特にトレオニンまたはグルタミン酸である；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；およびX202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号44または46などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号44または46）を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列に少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0139】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号95、96、もしくは119の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基90~211を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X7に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、またはアルギニンである；X96に対応する残基が、極性または酸性残基、特にトレオニンまたはグルタミン酸である；X120に対応する残基が、芳香族、非極性または脂肪族残基、特にバリンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X196に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；およびX202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号86などの先行する特徴を備えた配列番号2、4または98の参照配列と比較して他の残基位置に1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個の残基相違であ

り得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 86）を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0140】

いくつかの実施形態において、改良されたケトレダクターゼは、配列番号 95、96、もしくは 119 の配列式に基づくアミノ酸配列、またはその領域、例えば、残基 90 ~ 211 を含み、アミノ酸配列は、少なくとも次の特徴：X190 に対応する残基が、非芳香族残基、特にアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリンである；X7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束された、または塩基性残基、特にヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、またはアルギニンである；X97 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基、特にバリン、メチオニン、トレオニン、またはイソロイシンである；X147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性または芳香族残基、特にメチオニン、イソロイシン、ロイシン、またはフェニルアラニンである；および X202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にメチオニン、チロシン、またはトリプトファンである、を有する。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 88、90、92 または 94 などの先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 の参照配列と比較して他の残基位置に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、1 ~ 20、1 ~ 22、1 ~ 24、1 ~ 25、1 ~ 30、1 ~ 35 または約 1 ~ 40 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、他のアミノ酸残基において 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35 または約 40 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴（例えば、配列番号 88、90、92 または 94）を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0141】

いくつかの実施形態において、本開示の改良されたケトレダクターゼは、X190 に対応する残基がチロシンではない、配列番号 95、96、または 119 の配列式の残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインを有するアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインは、X190 に対応する残基が非芳香族残基、例えば、脂肪族、拘束、非極性、またはシステイン残基であるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインは、X190 に対応する残基がアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリン、特にプロリンであるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列の対応するドメインと比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、または 1 ~ 20 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または約 20 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、X190 に対応する残基が少なくとも

10

20

30

40

50

先行する特徴を有する配列番号 95、96、または 119 の配列式の残基 90 ~ 211 に対応するドメインまたは領域を備えたアミノ酸配列を含み、ドメインまたは領域のアミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列の残基 90 ~ 211 に対応するアミノ酸配列に少なくとも 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% の同一性を有する。

【0142】

いくつかの実施形態において、配列番号 95、96、または 119 の配列式の残基 90 ~ 211 に対応するドメインまたは領域を備え、本明細書に記載する X190 に対応する残基に規定された特徴を有するケトレダクターゼポリペプチドは領域またはドメイン内に、次のもの：X94 に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基である；X95 に対応する残基が、非極性または脂肪族残基である；X96 に対応する残基が、極性または酸性残基である；X97 に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基である；X120 に対応する残基が、芳香族、非極性または脂肪族残基である；X125 に対応する残基が、極性または非極性残基である；X147 に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基である；X149 に対応する残基が、非極性または芳香族残基である；X150 に対応する残基が、拘束または酸性残基である；X152 に対応する残基が、非極性または極性残基である；X196 に対応する残基が、脂肪族、非極性、または芳香族残基である；X202 に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基である；X205 に対応する残基が、塩基性、非極性または脂肪族残基である；および X206 に対応する残基が、非極性または芳香族残基である、から選択される 1 つ以上の特徴をさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、残基 90 ~ 211 に対応する領域またはドメインは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列の対応するドメインと比較して他のアミノ酸残基に約 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、1 ~ 16、1 ~ 18、または 1 ~ 20 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または約 20 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。

【0143】

いくつかの実施形態において、上記のような、配列番号 95、96、または 119 の配列式の残基 90 ~ 211 に対応するアミノ酸配列を備えたドメインまたは領域を有するケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 2、4 または 98 の対応するドメインのアミノ酸配列と比較してドメインまたは領域内に 1 つ以上の保存的変異を有することができる。このような保存的変異の例は、これに限定されるわけではないが：X94 アラニン (A) に対応する残基の、別の極性または脂肪族残基、例えば、バリン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換；X95 バリン (V) に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、アラニン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換；X96 セリン (S) に対応する残基の、別の極性残基、例えば、アスパラギン、グルタミン、またはトレオニンによる置換；X196 バリン (V) に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、アラニン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換；および X205 アラニン (A) に対応する残基の、別の非極性または脂肪族残基、例えば、バリン、ロイシン、またはイソロイシンによる置換などのアミノ酸置換を含む。

【0144】

いくつかの実施形態において、配列番号 95、96 または 119 の配列式の残基 90 ~ 211 に対応するドメインまたは領域を備え、本明細書に記載するような X190 に対応する残基に規定された特徴を有するケトレダクターゼポリペプチドは領域またはドメイン内に、次のもの：X94 に対応する残基が、システイン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアラニン、バリンまたはシステインである；X95 に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、

イソロイシン、特にイソロイシンまたはロイシンである；X 9 6 に対応する残基が、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にセリン、アスパラギン、トレオニンまたはグルタミン酸である；X 9 7 に対応する残基が、セリン、トレオニン、アスパラギン、グルタミン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、リジンまたはアルギニン、特にリジン、トレオニン、バリン、アルギニン、メチオニン、またはイソロイシンである；X 1 2 0 に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にフェニルアラニンまたはバリンである；X 1 2 5 に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にグリシンまたはセリンである；X 1 4 2 に対応する残基が、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン残基、特にアスパラギンである；X 1 4 7 に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にフェニルアラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、またはグルタミンである；X 1 4 9 に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、またはトリプトファン、特にグリシンまたはフェニルアラニンである；X 1 5 0 に対応する残基が、プロリン、ヒスチジン、アスパラギン酸、またはグルタミン酸、特にアスパラギン酸またはヒスチジンである；X 1 5 2 に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にセリン、トレオニン、またはメチオニンである；X 1 9 6 に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にバリン、イソロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、またはイソロイシンである；X 2 0 2 に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアラニン、トリプトファン、チロシン、またはメチオニンである；X 2 0 5 に対応する残基が、リジン、アルギニン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアルギニンである；およびX 2 0 6 に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、特にメチオニンまたはチロシンである、から選択される1つ以上の特徴をさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、残基90～211に対応する領域またはドメインは、配列番号2、4または98の参照配列の対応するドメインと比較して他のアミノ酸残基に約1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、または1～20個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または約20個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。

【0145】

いくつかの実施形態において、配列番号95、96または119の配列式の残基90～211に対応するドメインまたは領域を備え、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に規定された特徴を有するケトレダクターゼポリペプチドは領域またはドメイン内に、次のもの：X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである、およびX202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、から選択される1つ以上またはすべての特徴をさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、残基90～211に対応する領域またはドメインは、配列番号2、4または98の参照配列のドメインと比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、または1～20個の残基相違をさらに有す

10

20

30

40

50

ることができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または約20個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列の残基90～111に対応するアミノ酸配列と比較して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0146】

いくつかの実施形態において、配列番号95、96または119の配列式の残基90～211に対応するドメインまたは領域を備え、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に規定された特徴を有するケトレダクターゼポリペプチドは領域またはドメイン内に、次のもの：X97に対応する残基が、極性、非極性、脂肪族、または塩基性残基、特にメチオニン、バリン、イソロイシン、トレオニン、またはアルギニンである；X147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、ロイシン、またはイソロイシンである；X202に対応する残基が、脂肪族、芳香族、または非極性残基、特にトリプトファン、メチオニン、またはチロシンである、から選択される1つ以上またはすべての特徴をさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、残基90～211に対応する領域またはドメインは、配列番号2、4または98の参照配列のドメインと比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、または1～20個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または約20個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列の残基90～211に対応するアミノ酸配列と比較して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

【0147】

いくつかの実施形態において、配列番号95、96または119の配列式の残基90～211に対応するドメインまたは領域を備え、本明細書に記載するようなX190に対応する残基に規定された特徴を有するケトレダクターゼポリペプチドは領域またはドメイン内に、次のもの：X94に対応する残基が、システイン、非極性または脂肪族残基、特にシステインまたはバリンである；X96に対応する残基が、極性または酸性残基、特にトレオニンである；およびX147に対応する残基が、芳香族、極性、非極性、または脂肪族残基、特にグルタミン、イソロイシン、またはロイシンである、から選択される1つ以上またはすべての特徴をさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、残基90～211に対応する領域またはドメインは、配列番号2、4または98の参照配列のドメインと比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、1～16、1～18、または1～20個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または約20個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列の残基90～211に対応するアミノ酸配列と比較して少なくとも85%、86%

、 87 %、 88 %、 89 %、 90 %、 91 %、 92 %、 93 %、 94 %、 95 %、 96 %、 97 %、 98 %、 または 99 % の同一性を有する。

【 0148 】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 95、96 または 119 の配列式の残基 1 ~ 89 に対応するドメインまたは領域をさらに含むことができる。いくつかの実施形態において、残基 1 ~ 89 に対応する領域またはドメインは、次の特徴：X7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基である；X16 に対応する残基が、極性残基である；X43 に対応する残基が、非極性または極性残基である；および X60 に対応する残基が、芳香族または極性、または脂肪族残基である、の 1 つ以上を有することができる。

10

【 0149 】

いくつかの実施形態において、残基 1 ~ 89 に対応するドメインまたは領域は、X7 に対応する残基に芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジンを有する配列番号 2、4、または 98 に基づく参照配列の残基 1 ~ 89 に対応するアミノ酸配列に少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有することができるが、但し、ケトレダクターゼポリペプチドの領域またはドメインが、X7 に対応する残基が芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基、特にヒスチジンであるアミノ酸配列を有することを条件とする。いくつかの実施形態において、残基 1 ~ 89 に対応する領域またはドメインは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列のドメインと比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、また 1 ~ 16 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、または約 16 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列の残基 1 ~ 89 に対応するアミノ酸配列と比較して少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

20

30

【 0150 】

いくつかの実施形態において、残基 1 ~ 89 に対応する領域またはドメインは、次の特徴：X7 に対応する残基が、芳香族、非極性、極性、拘束、または塩基性残基である；X16 に対応する残基が、極性残基である；X43 に対応する残基が、非極性または極性残基である；および X60 に対応する残基が、芳香族または極性、または脂肪族残基である、の 1 つ以上または少なくともすべてを有することができる。いくつかの実施形態において、残基 1 ~ 89 に対応する領域またはドメインは、配列番号 2、4 または 98 の参照配列のドメインと比較して他のアミノ酸残基に 1 ~ 2、1 ~ 3、1 ~ 4、1 ~ 5、1 ~ 6、1 ~ 7、1 ~ 8、1 ~ 9、1 ~ 10、1 ~ 11、1 ~ 12、1 ~ 14、1 ~ 15、また 1 ~ 16 個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、または 16 個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号 2、4 または 98 に基づく参照配列の残基 1 ~ 89 に対応するアミノ酸配列と比較して少なくとも 85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、または 99 % の同一性を有する。

40

【 0151 】

いくつかの実施形態において、残基 1 ~ 89 に対応する領域またはドメインは、次の特

50

徴：X 7に対応する残基が、トリプトファン、チロシン、フェニルアラニン、プロリン、ヒスチジン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、セリン、トレオニン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン、特にグリシン、ヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、ヒスチジン、またはアスパラギンである；X 16に対応する残基が、セリン、トレオニン、アスパラギン、またはグルタミン、特にセリンである；X 43に対応する残基が、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にイソロイシンである；およびX 60に対応する残基が、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、グリシン、メチオニン、アラニン、バリン、ロイシン、またはイソロイシン、特にアラニンである、の1つ以上または少なくともすべてを有することができる。いくつかの実施形態において、残基1～89に対応する領域またはドメインは、配列番号2、4または98の参照配列のドメインと比較して他のアミノ酸残基に1～2、1～3、1～4、1～5、1～6、1～7、1～8、1～9、1～10、1～11、1～12、1～14、1～15、また1～16個の残基相違をさらに有することができる。いくつかの実施形態において、相違の数は、ドメイン内の他のアミノ酸残基にて1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、または16個の残基相違であり得る。いくつかの実施形態において、相違は保存的変異を含む。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも先行する特徴を備えたアミノ酸配列を含み、アミノ酸配列は、先行する特徴を備えた配列番号2、4または98に基づく参照配列の残基1～89に対応するアミノ酸配列と比較して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の同一性を有する。

10

20

【0152】

下の表2は、本発明で開示した配列番号のいくつかのリストを、置換アセトフェノンの還元に関する関連する活性レベルと共に示す。下のすべての配列は、別途規定しない限り、野生型L. kefirケトレダクターゼ配列（配列番号3および4）に由来する。

【0153】

【表 2】

表2:配列のリスト

ポリヌクレオチド配列番号	ポリペプチド配列番号	配列番号4と比較したポリペプチド残基置換	活性	安定性
3	4	なし(野生型L. kefir配列)	-	-
5	6	Y190C	+	-
7	8	Y190A;V196I;	++	+
9	10	Y190P;V196I;	++	
11	12	K97R;Y190C;	+	
13	14	Y190P;V196L	++	
15	16	Y190A;V196L	++	+
47	48	Y190P;V196M;	+	
49	50	Y190P;V196F;	+	
51	52	G125S;Y190P;V196L;	+	
19	20	V95I;Y190P;V196I;	+	+
17	18	T152M;Y190P;V196I;M205R;	+++	+
23	24	Y190P;V196L; (配列番号2と比較)	++	
25	26	Y190A;V196L; (配列番号2と比較)	++	+
35	36	Y190P;V196L;M206Y;	+++	
53	54	G7N;Y190A;V196L;	++	+
55	56	G7H;Y190P;V196L;	++	
61	62	V95L;Y190P;V196L;	++	
63	64	V95I;Y190P;V196L;	++	
57	58	T16S;Y190P;V196L;	++	
59	60	Y190P;V196L	++	
21	22	F147L;Y190P;V196L;	++	++
65	66	F147Q;Y190A;V196L;	++	+
67	68	F147I;Y190P;V196L;	++	++
69	70	V43I;F147L;Y190P;V196L;	++	++
71	72	F147L;Y190A;V196L;	++	++
31	32	Y190P;V196L;A202W;	+++	+
27	28	Y190P;V196L;A202M;	++	+
29	30	Y190A;V196L;A202Y;	++	+
33	34	A94V;Y190A;V196L;M205V;	+++	+
73	74	K97R;F147I;Y190P;V196L;	+++	+
37	38	F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
39	40	G7H;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
75	76	G7T;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
77	78	G7P;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
79	80	G7W;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
81	82	G7R;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
83	84	G7H;A94C;F147L;G149F;D150H;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
41	42	G7H;A94V;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
43	44	G7H;S96E;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
85	86	G7H;S96T;F120V;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
45	46	G7H;S96T;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
87	88	G7H;K97V;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
89	90	G7H;K97M;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
91	92	G7H;K97T;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++
93	94	G7H;K97I;F147L;Y190P;V196L;A202W;	+++	++

上の表 2 では、活性の欄で、プラス 1 個「+」は、配列番号 6 の活性の 1 0 0 ~ 4 5 0

10

20

30

40

50

%の活性改良を表し、プラス2個「++」は、配列番号6の450～1500%の活性改良を表し、プラス3個「+++」は、配列番号6の1500%を超える活性改良を表す。安定性の欄において、プラス1個「+」は、50 にて2時間の処理後にポリペプチドが測定可能な活性を示すことを表し、プラス2個「++」は、50 にて2時間の熱処理後に両方のタンパク質の活性を比較したときに、ポリペプチドが配列番号16と比較して活性の400%を超える改良を有することを表す。

【0154】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、(S)選択性、例えば、配列番号6を有する改変KRED酵素と比較して、その酵素活性の率、例えば、基質を生成物に変換する率に関して改良されている。配列番号6の配列を有するポリペプチドが本明細書で参照ポリペプチドとして使用されるのは、野生型L.kefirまたはL.brevis KREDが、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに変換するための感知可能な活性を示さないためである。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号6の率の少なくとも5倍、10倍、25倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、250倍、または300倍の率で基質を生成物に変換することができる。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号6の率の少なくとも100%、150%、250%、300%、400%、450%、500%、750%、1000%、1250%、または1500%である率で基質を生成物に変換することができる。

【0155】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも改良された率で変換することができる。酵素活性に関して配列番号6よりも改良されている例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0156】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも改良された率で変換することができ、ポリペプチドは、配列番号6の配列を有するポリペプチドと比較して改良された熱安定性も有する。このような改良を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、16、18、20、22、26、28、30、32、34、38、40、42、44、46、54、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0157】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2, 6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約450%大きい率で変換することができる。このような改良が可能である例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、10、14、16、18、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、54、56、58、60、62

、 64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0158】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約450%大きい率で変換することができ、ポリペプチドは、配列番号6の配列を有するポリペプチドと比較して改良された熱安定性も有する。このような特性を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号8、16、18、22、26、28、30、32、34、38、40、42、44、46、54、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

10

【0159】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約1500%大きい率で変換することができる。このような改良が可能である例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

20

【0160】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約1500%大きい率で変換することができ、ポリペプチドは、配列番号6の配列を有するポリペプチドと比較して改良された熱安定性も有する。このような特性を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

30

【0161】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質の量に対して約1重量%未満の量のポリペプチドを用いて実施するときに、約24時間未満で2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エタノールに少なくとも約99%の立体異性体過剰率で変換することができる。この能力を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

40

【0162】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、2'、6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに、99%を超える立体異性体過剰率で、および配列番号6を有するケトレダクターゼポリペプチドよりも少なくとも約450%大きい率で変換することができ、ポリペプチドは50で2時間の熱処理の後に、配列番号16の配列を有するポリペプチドよりも少なくとも約400%大きい率で基質を生成物に変換することもできる(配列番号16のポリペプチドも同じ熱処理によって処理された場合)。このような特性を有する例示的なポリペプチドは、これに限定されるわけではないが、配列番号1

50

8、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94に対応するアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。

【0163】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも約99%であるエナンチオマー過剰率で基質を生成物に立体選択的に還元することが可能であり、ポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、または94に対応するアミノ酸配列を含む。

10

【0164】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、少なくとも約25%、50%、75%、80%、85%、85%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、または99.99%の立体異性体過剰パーセントで、2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)エタノールに立体選択的に還元することができる。

【0165】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4もしくは98、またはその領域もしくはドメイン、例えば、残基90~211に少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%同一であるアミノ酸配列を含むことができるが、但し、残基X190に対応する残基がチロシン、特に非芳香族残基でないことを条件とし、ポリペプチドは少なくとも約85%のエナンチオマー過剰率で基質を生成物に還元できる。いくつかの実施形態において、X190に対応する残基は、脂肪族、拘束された、非極性、またはシステイン残基である。いくつかの実施形態において、X190に対応する残基はプロリンであり、ポリペプチドが(立体選択性、酵素活性、および/または熱安定性について)野生型L.kefirケトレダクターゼまたは別の改変ケトレダクターゼよりもさらに改良されるように、次の置換: 7 H、T、P、W、R、N(すなわち配列番号2、4、または98の残基7に対応する残基が、ヒスチジン、トレオニン、プロリン、トリプトファン、アルギニン、またはアスパラギンに置換される); 16 S; 43 I; 60 A; 94 C、V; 95 I、L; 96 E、T; 97 R、V、M、T、I; 120 V; 125 S; 142 N; 147 L、Q、I、V; 149 F; 150 H; 152 H; 196 I、L、M、F; 202 W、M、F; および206 Y、の1つ以上をさらに有する。

20

30

いくつかの実施形態において、X190に対応する残基はプロリンであり、ポリペプチドが野生型kefirケトレダクターゼまたは別の改変ケトレダクターゼよりもさらに改良されるように、次の置換: 7 H; 94 V; 96 T; 147 L; 196 L; および202 Wの1つ以上をさらに有する。

【0166】

40

当業者に認識されるように、上で定義したカテゴリのいくつかは、別途規定しない限り、相互に排他的ではない。それゆえ、2つ以上の物理化学特性を示す側鎖を有するアミノ酸は、複数のカテゴリに含まれ得る。任意のアミノ酸または残基の適切な分類は、特に本明細書に与える詳細な開示を考慮すれば、当業者に明らかとなるだろう。

【0167】

いくつかの実施形態において、改良された改変ケトレダクターゼ酵素は、天然に存在するケトレダクターゼポリペプチドの欠失または他の改変ケトレダクターゼポリペプチドの欠失を含む。いくつかの実施形態において、本明細書に記載する改良された改変ケトレダクターゼ酵素はそれぞれ、本明細書に記載する欠失を含むことができる。それゆえ、本開示のケトレダクターゼポリペプチドの1つ1つの実施形態では、欠失は、ケトレダクター

50

ゼ活性の機能活性が維持される限り、ケトレダクターゼポリペプチドの、1個以上のアミノ酸、2個以上のアミノ酸、3個以上のアミノ酸、4個以上のアミノ酸、5個以上のアミノ酸、6個以上のアミノ酸、8個以上のアミノ酸、10個以上のアミノ酸、15個以上のアミノ酸、または20個以上のアミノ酸、アミノ酸の総数の10%まで、アミノ酸の総数の20%まで、またはアミノ酸の総数の30%を含むことができる。いくつかの実施形態において、欠失は、約1~2、1~3、1~4、1~5、1~6、1~7、1~8、1~9、1~10、1~11、1~12、1~14、1~15、1~16、1~18、1~20、1~22、1~24、1~25、1~30、1~35または約1~40個のアミノ酸残基を含むことができる。いくつかの実施形態において、欠失の数は1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、20、22、24、26、30、35または約40個のアミノ酸であり得る。いくつかの実施形態において、欠失は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、15、16、18、または20個のアミノ酸残基であり得る。

【0168】

本明細書に記載するように、本開示のケトレダクターゼポリペプチドは、ケトレダクターゼポリペプチドが他のポリペプチド、例えば、抗体タグ（例えば、mycエピトープ）または精製配列（例えば、Hisタグ）に融合された融合ポリペプチドの形であり得る。それゆえ、ケトレダクターゼポリペプチドは、他のポリペプチドへの融合があってもなくても使用できる。

【0169】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するポリペプチドは、遺伝的にコードされたアミノ酸に限定されない。遺伝的にコードされたアミノ酸に加えて、本明細書に記載するポリペプチドは、全部または一部のどちらかが、天然に存在するおよび/または合成非コードアミノ酸より成り得る。本明細書に記載するポリペプチドの、ある一般に見られる非コードアミノ酸は、これに限定されるわけではないが：遺伝的にコードされたアミノ酸のD-立体異性体；2,3-ジアミノプロピオン酸（Dpr）；-アミノイソ酪酸（Aib）；-アミノヘキサ酸（Aha）；-アミノ吉草酸（Ava）；N-メチルグリシンまたはサルコシン（MeGlyまたはSar）；オルニチン（Orn）；シトルリン（Cit）；t-ブチルアラニン（Bua）；t-ブチルグリシン（Bug）；N-メチルイソロシン（MeIle）；フェニルグリシン（Phg）；シクロヘキシルアラニン（Cha）；ノルロイシン（Nle）；ナフチルアラニン（Nal）；2-クロロフェニルアラニン（Ocf）；3-クロロフェニルアラニン（Mcf）；4-クロロフェニルアラニン（Pcf）；2-フルオロフェニルアラニン（Off）；3-フルオロフェニルアラニン（Mff）；4-フルオロフェニルアラニン（Pff）；2-ブromoフェニルアラニン（Obf）；3-ブromoフェニルアラニン（Mbf）；4-ブromoフェニルアラニン（Pbf）；2-メチルフェニルアラニン（Omf）；3-メチルフェニルアラニン（Mmf）；4-メチルフェニルアラニン（Pmf）；2-ニトロフェニルアラニン（Onf）；3-ニトロフェニルアラニン（Mnf）；4-ニトロフェニルアラニン（Pnf）；2-シアノフェニルアラニン（Ocf）；3-シアノフェニルアラニン（Mcf）；4-シアノフェニルアラニン（Pcf）；2-トリフルオロメチルフェニルアラニン（Otf）；3-トリフルオロメチルフェニルアラニン（Mtf）；4-トリフルオロメチルフェニルアラニン（Ptf）；4-アミノフェニルアラニン（Paf）；4-ヨードフェニルアラニン（Pif）；4-アミノメチルフェニルアラニン（Pamf）；2,4-ジクロロフェニルアラニン（Opef）；3,4-ジクロロフェニルアラニン（Mpcf）；2,4-ジフルオロフェニルアラニン（Opff）；3,4-ジフルオロフェニルアラニン（Mpff）；ピリジ-2-イルアラニン（2pAla）；ピリジ-3-イルアラニン（3pAla）；ピリジ-4-イルアラニン（4pAla）；ナフチ-1-イルアラニン（1nAla）；ナフチ-2-イルアラニン（2nAla）；チアゾリルアラニン（taAla）；ベンゾチエニルアラニン（bAla）；チエニルアラニン（tAla）；フリルアラニン（fAla）；ホモフェニルアラニン（hPhe）；ホモチロシン（hTy

10

20

30

40

50

); ホモトリプトファン (hTrp); ペンタフルオロフェニルアラニン (5ff); スチリルアラニン (sAla); アウトリルアラニン (aAla); 3, 3 - ジフェニルアラニン (Dfa); 3 - アミノ - 5 - フェニペンタン酸 (Afp); ペニシラミン (Pen); 1, 2, 3, 4 - テトラヒドロイソキノリン - 3 - カルボン酸 (Tic); - 2 - チエニルアラニン (Thi); メチオニンスルホキシド (Mso); N(w) - ニトロアルギニン (nArg); ホモリジン (hLys); ホスホノメチルフェニルアラニン (pmPhe); ホスホセリン (pSer); ホスホトレオニン (pThr); ホモアスパラギン酸 (hAsp); ホモグルタミン酸 (hGlu); 1 - アミノシクロペンタ - (2 または 3) - エン - 4 カルボン酸; ピペコリン酸 (PA)、アゼチジン - 3 - カルボン酸 (ACA); 1 - アミノシクロペンタン - 3 - カルボン酸; アリルグリシン (aOly); プロパギルグリシン (pgGly); ホモアラニン (hAla); ノルバリン (nVal); ホモロイシン (hLeu)、ホモバリン (hVal); ホモイソロイシン (hIle); ホモアルギニン (hArg); N - アセチルリジン (AcLys); 2, 4 - ジアミノ酪酸 (Dbu); 2, 3 - ジアミノ酪酸 (Dab); N - メチルバリン (MeVal); ホモシステイン (hCys); ホモセリン (hSer); ヒドロキシプロリン (Hyp) および ホモプロリン (hPro) を含む。本明細書に記載するポリペプチドが構成され得るさらなる非コードアミノ酸は、当業者に明らかになるだろう (例えば、Fasman, 1989, CRC Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 3 - 70 および本明細書で引用した参考文献に示された各種のアミノ酸を参照、そのすべては参照により組入れられている)。これらのアミノ酸は、L - または D - 立体配置のどちらかであり得る。

【0170】

当業者は、側鎖保護基を持つアミノ酸または残基も本明細書に記載するポリペプチドを構成し得ることを認識するであろう。このような保護アミノ酸の非制限的な例は、この場合は芳香族カテゴリに属し (保護基はカッコ内に挙げる)、これに限定されるわけではないが: Arg(tos)、Cys(メチルベンジル)、Cys(ニトロピリジンスルフェニル)、Glu(-ベンジルエステル)、Gln(キサンチル)、Asn(N - キサンチル)、His(bom)、His(ベンジル)、His(tos)、Lys(fmoc)、Lys(tos)、Ser(O - ベンジル)、Thr(O - ベンジル) および Tyr(O - ベンジル) を含む。

【0171】

本明細書に記載するポリペプチドが構成され得る立体配座的に制限された非コードアミノ酸は、これに限定されるわけではないが、N - メチルアミノ酸 (L - 立体配置); 1 - アミノシクロペンタ - (2 または 3) - エン - 4 - カルボン酸; ピペコリン酸; アゼチジン - 3 - カルボン酸; ホモプロリン (hPro); および 1 - アミノシクロペンタン - 3 - カルボン酸を含む。

【0172】

上記のように、改変ケトレダクターゼ酵素を産生するために天然に存在するポリペプチドに導入された各種の修飾は、酵素の特異的な特性を標的とすることができる。

改変ケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチド

別の態様において、本開示は、改変ケトレダクターゼ酵素をコードするポリヌクレオチドを提供する。ポリヌクレオチドは、遺伝子発現を制御してポリペプチドを発現できる組み換えポリヌクレオチドを生成する 1 つ以上の異種調節配列に動作可能に結合され得る。改変ケトレダクターゼをコードする異種ポリヌクレオチドを含有する発現構築物は、対応するケトレダクターゼポリペプチドを発現するために適切な宿主細胞中に導入できる。

【0173】

各種のアミノ酸に対応するコドンが知られているため、タンパク質配列が入手できることによって対象をコードできるすべてのポリヌクレオチドの記述が得られる。同じアミノ酸が代わりのまたは同義のコドンによってコードされる、遺伝コードの縮重によって極め

10

20

30

40

50

て多数の核酸が作製され、その核酸はすべて本明細書に開示される改良ケトレダクターゼ酵素をコードする。それゆえ、当業者は、特定のアミノ酸配列を同定すると、タンパク質のアミノ酸配列を変えない方法で1つ以上のコドンの配列を修飾するだけで任意の数の異なる核酸を作製できる。この点で、本開示は、可能なコドン選択に基づいて組み合わせを選択することによって作製できる1つ1つの可能なポリヌクレオチドの変形を特に考慮しており、このような変形はすべて、表2に示したアミノ酸配列を含めて本明細書に開示する任意のポリペプチドについて特に開示されると見なされる。各種の実施形態において、コドンは好ましくは、タンパク質が産生される宿主細胞に適合するように選択される。例えば、細菌で使用される好ましいコドンは、細菌中で遺伝子を発現するために使用される；酵母で使用される好ましいコドンは、酵母中での発現に使用される；および哺乳動物で使用される好ましいコドンは、哺乳動物細胞での発現に使用される。一例として、配列番号3のポリヌクレオチドは、*E. coli* 中での発現に最適化されたコドンであるが、そうでなければ *Lactobacillus kefir* の天然に存在するケトレダクターゼをコードする。

【0174】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載する参照改変ケトレダクターゼポリペプチドのいずれかに対して少なくとも約85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%またはそれ以上の配列同一性を有するアミノ酸配列を備えたケトレダクターゼポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含み、コードされたケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号2、4または98のX190に対応する残基がチロシンでないアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、X190に対応する残基が非芳香族残基であるアミノ酸配列を含むケトレダクターゼポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリペプチドは、X190に対応する残基がアラニン、イソロイシン、システイン、またはプロリン、特にプロリンであるアミノ酸配列を含むケトレダクターゼポリペプチドをコードする。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94から選択されるアミノ酸配列を含む改変ケトレダクターゼポリペプチドをコードする。

【0175】

いくつかの実施形態において、改変ケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチドは、配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、および93から選択される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、高ストリンジェント条件下で配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、および93を含むヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能であり、高ストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、置換アセトフェノン基質に対して(S)-選択性を有し、例えば、構造式(I)の基質を構造式(II)の生成物に還元または変換することができる。いくつかの実施形態において、高ストリンジェント条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、構造式(III)の基質を構造式(IV)の生成物に還元または変換できる。

【0176】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは本明細書に記載するポリペプチドをコードするが、改変ケトレダクターゼをコードする参照ポリヌクレオチドに対してヌクレ

10

20

30

40

50

オチドレベルで、約 80% またはそれ以上の配列同一性、約 85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または 99% またはそれ以上の配列同一性を有する。いくつかの実施形態において、参照ポリヌクレオチドは、配列番号 5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、および 93 に対応するポリヌクレオチド配列から選択される。

【0177】

改良されたケトレダクターゼポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチドは、ポリペプチドの発現を与える各種の方法で操作され得る。単離ポリヌクレオチドの操作は、発現ベクターによってベクターへのその挿入前であることが所望または必要であり得る。組み換え DNA 法を利用してポリヌクレオチドおよび核酸配列を修飾する技法は、当分野で周知である。ガイダンスは、Sambrook ら、2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press; および *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F. ed., Greene Pub. Associates, 1998, updates to 2006 に与えられている。

【0178】

細菌宿主細胞では、本開示の核酸構築物の転写を指示する好適なプロモータは、*E. coli lac* オペロン、*Streptomyces coelicolor* アガラゼ遺伝子 (*dagA*)、*Bacillus subtilis* レバンスクラゼ遺伝子 (*sacB*)、*Bacillus licheniformis* アルファ - アミラーゼ遺伝子 (*amyL*)、*Bacillus stearothermophilus* マルトジェニックアミラーゼ遺伝子 (*amyM*)、*Bacillus amyloliquefaciens* アルファ - アミラーゼ遺伝子 (*amyQ*)、*Bacillus licheniformis* ペニシリナーゼ遺伝子 (*penP*)、*Bacillus subtilis* *xyIA* および *xyIB* 遺伝子、ならびに原核生物ベータ - ラクタマーゼ遺伝子 (*VilA* - Kamaroff ら、1978, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 75: 3727 - 3731) から得られたプロモータはもちろんのこと、*tac* プロモータ (DeBoer ら、1983, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 80: 21 - 25) も含む。さらなるプロモータは、Sambrook ら、同上に記載されている。

【0179】

糸状真菌宿主細胞では、本開示の核酸構築物の転写を指示する好適なプロモータは、*Aspergillus oryzae* TAKA アミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Aspergillus niger* 中性アルファ - アミラーゼ、*Aspergillus niger* 酸安定性アルファ - アミラーゼ、*Aspergillus niger* または *Aspergillus awamori* グルコアミラーゼ (*glA* A)、*Rhizomucor miehei* リパーゼ、*Aspergillus oryzae* アルカリ性プロテアーゼ、*Aspergillus oryzae* トリオースリン酸異性化酵素、*Aspergillus nidulans* アセトアミダーゼ、および *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ (WO 96/00787) の遺伝子から得られたプロモータはもちろんのこと、NA2 - *tpi* プロモータ (*Aspergillus niger* 中性アルファ - アミラーゼおよび *Aspergillus oryzae* トリオースリン酸異性化酵素の遺伝子からのプロモータのハイブリッド)、ならびにそのミュータント、切断、およびハイブリッドプロモータも含む。

【0180】

酵母宿主では、有用なプロモータは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ (ENO-1)、*Saccharomyces cerevisiae* ガラクトキナーゼ (GAL1)、*Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP)、および *Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセレートキナーゼの遺伝子からであり得る。酵母宿主細胞の他の有用なプロモータは、Romanosら、1992, *Yeast* 8:423-488に記載されている。

【0181】

制御配列は、好適な転写ターミネータ配列、すなわち転写を終了することが宿主によって認識された配列でもあり得る。ターミネータ配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の3'末端に操作可能に結合される。最適な宿主細胞中で機能性であるいずれのターミネータも本発明で使用され得る。

10

【0182】

例えば、糸状真菌宿主細胞の例示的な転写ターミネータは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸合成酵素、*Aspergillus niger* アルファ-グルコシダーゼ、および *Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼの遺伝子から得られる。

【0183】

酵母宿主細胞の例示的なターミネータは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* チトクロムC (CYC1)、および *Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスフェートデヒドロゲナーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞の他の有用なターミネータは、Romanosら、1992, 同上に記載されている。

20

【0184】

制御配列は、好適なリーダー配列、すなわち宿主細胞による翻訳にとって重要であるmRNAの領域の非翻訳領域でもあり得る。リーダー配列は、ポリペプチドをコードする核酸配列の5'末端に操作可能に連結される。最適な宿主細胞において機能性であるいずれのリーダー配列も使用され得る。糸状真菌宿主細胞のための例示的なリーダー配列は、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼおよび *Aspergillus nidulans* トリオースリン酸異性化酵素の遺伝子から得られる。酵母宿主細胞に好適なリーダーは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ (ENO-1)、*Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセレートキナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* アルファ因子、および *Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセルアルデヒド-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼ (ADH2/GAP) の遺伝子から得られる。

30

【0185】

制御配列は、ポリアデニル化配列、すなわち核酸配列の3'末端に操作可能に連結され、転写されるときに、転写mRNAにポリアデノシン残基を付加するシグナルとして宿主細胞によって認識される配列でもあり得る。最適な宿主細胞中で機能性であるいずれのポリアデニル化配列も本発明で使用され得る。糸状真菌宿主細胞の例示的なポリアデニル化配列は、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニル酸合成酵素、*Fusarium oxysporum* トリプシン様プロテアーゼ、および *Aspergillus niger* アルファ-グルコシダーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞の有用なポリアデニル化配列は、Guo and Sherman, 1995, *Mol Cell Bio* 15:5983-5990によって記載されている。

40

【0186】

50

制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に連結されたアミノ酸配列をコードして、コードされたポリペプチドを細胞の分泌経路に向けるシグナルペプチドをコードする領域でもあり得る。核酸配列のコード配列の5'端は、分泌ポリペプチドをコードするコード領域のセグメントを備えた翻訳読み枠内に自然に結合されたシグナルペプチドをコードする領域を固有に含有することができる。または、コード配列の5'端は、コード配列に外来性であるシグナルペプチドをコードする領域を含有することができる。外来性シグナルペプチドをコードする領域は、コード配列がシグナルペプチドをコードする領域を自然に含有していない場合に要求され得る。

【0187】

または、外来性シグナルペプチドをコードする領域は、ポリペプチドの分泌を促進するために、シグナルペプチドをコードする領域を単に置換することがある。しかし、発現されたポリペプチドを最適な宿主細胞の分泌経路に向けるいずれのシグナルペプチドをコードする領域も本発明で使用され得る。

【0188】

細菌宿主細胞の有効シグナルペプチドをコードする領域は、*Bacillus* NC1 B 11837 マルトジェニックアミラーゼ、*Bacillus* *stearothermophilus* アルファ - アミラーゼ、*Bacillus* *licheniformis* スブチリシン、*Bacillus* *licheniformis* ベータ - ラクターマーゼ、*Bacillus* *stearothermophilus* 中性プロテアーゼ (npr T、npr S、npr M)、および *Bacillus* *subtilis* prs A の遺伝子から得たシグナル・ペプチド・コード領域である。さらなるシグナルペプチドは、Simonen and Palva, 1993, *Microbiol Rev* 57:109-137 に記載されている。

【0189】

糸状真菌宿主細胞の有効なシグナルペプチドをコードする領域は、*Aspergillus* *oryzae* TAKA アミラーゼ、*Aspergillus* *niger* 中性アミラーゼ、*Aspergillus* *niger* グルコアミラーゼ、*Rhizomucor* *mieheei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、*Humicola* *insolens* セルラーゼ、および *Humicola* *lanuginosa* リパーゼの遺伝子から得たシグナルペプチドをコードする領域であり得る。

【0190】

酵母宿主細胞の有用なシグナルペプチドは、*Saccharomyces* *cerevisiae* アルファ因子および *Saccharomyces* *cerevisiae* インベルターゼの遺伝子からであり得る。他の有用なシグナルペプチドをコードする領域は、Romanos ら、1992、同上に記載されている。

【0191】

制御配列は、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域でもあり得る。得られたポリペプチドは、プロ酵素またはプロポリペプチド（またはいくつかの場合ではチモーゲン）として公知である。プロポリペプチドは一般に不活性であり、プロポリペプチドからのプロペプチドの触媒的または自己触媒的切断によって成熟した活性ポリペプチドに変換できる。プロペプチドコード領域は、*Bacillus* *subtilis* アルカリプロテアーゼ (apr E)、*Bacillus* *subtilis* 中性プロテアーゼ (npr T)、*Saccharomyces* *cerevisiae* アルファ因子、*Rhizomucor* *mieheei* アスパラギン酸プロテイナーゼ、および *Myceliophthora* *thermophila* ラクターゼ (WO 95/33836) の遺伝子から得られる。

【0192】

シグナルペプチドおよびプロペプチド領域の両方がポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、プロペプチド領域はポリペプチドのアミノ末端に隣接して位置しており、シグナルペプチド領域はプロペプチド領域のアミノ末端に隣接して位置している。

【0193】

宿主細胞の成長に対するポリペプチドの発現の調節を可能にする調節配列を付加することも所望であり得る。調節系の例は、調節化合物の存在を含む化学的または物理的刺激に応答して遺伝子の発現のオンまたはオフを引き起こす調節系である。原核宿主細胞では、好適な調節配列はlac、tacおよびtrpオペレータ系を含む。酵母宿主細胞では、好適な調節系は例として、ADH2系またはGAL1系を含む。糸状真菌では、好適な調節配列は、TAKAアルファ-アミラーゼプロモータ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼプロモータ、および*Aspergillus oryzae* グルコアミラーゼプロモータを含む。

【0194】

調節配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にする調節配列である。真核系では、これらはメトトレキサートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子と、重金属によって増幅されるメタロチオネインとを含む。これらの場合では、本発明のKREDポリペプチドをコードする核酸配列は調節配列と操作可能に連結されるであろう。

【0195】

それゆえ、いくつかの実施形態において、本開示は、改変ケトレダクターゼポリペプチドまたはその変異体をコードするポリヌクレオチド、およびそれらが導入される宿主の種類に応じたプロモータおよびターミネータ、複製起点などの1つ以上の発現調節領域を含む組み換え発現ベクターにも関する。上述の各種の核酸および制御配列は共に結合されて、1つ以上の好都合な制限部位を含むことができる組み換え発現ベクターを生成して、制限部位はこのような部位でのポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にする。または、本開示の核酸配列は、核酸配列または配列を含む核酸構築物を発現に適切なベクターに挿入することによって発現され得る。発現ベクターを作製する際に、コード配列が発現に適切な制御配列と操作可能に連結するように、コード配列はベクター内に配置される。

【0196】

組み換え発現ベクターは、組み換えDNA手順に従って好都合に組み換えすることができる、ポリヌクレオチド配列の発現を引き起こすことができる、任意のベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）であり得る。ベクターの選択は通例、ベクターとベクターが導入される宿主細胞との適合性によって変わるであろう。ベクターは直鎖状または閉環状プラスミドであり得る。

【0197】

発現ベクターは、自己複製ベクター、すなわち、その増幅が染色体複製とは無関係である染色体外実体として存在するベクター、例えば、プラスミド、染色体外要素、ミニ染色体、または人工染色体であり得る。ベクターは確実に自己複製するための任意の手段を含有することができる。または、ベクターは、宿主細胞中に導入されるときに、ゲノムに組み込まれ、ベクターが中に組み込まれた染色体と共に増幅されるベクターであり得る。さらに、宿主細胞のゲノムに導入される全DNA、またはトランスポゾンと共に含有する1つのベクターまたはプラスミドまたは2つ以上のベクターまたはプラスミドが使用され得る。

【0198】

本発明の発現ベクターは好ましくは、形質転換された細胞を容易に選択できるようにする1つ以上の選択可能なマーカーを含む。選択可能なマーカーは遺伝子であり、その生成物は殺生物剤またはウイルス耐性、重金属耐性、原栄養体から栄養要求体などを供給する。細菌性の選択可能なマーカーの例は、*Bacillus subtilis* または *Bacillus licheniformis* からのdal遺伝子、またはアンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール（実施例1）もしくはテトラサイクリン耐性などの抗生物質耐性を与えるマーカーである。酵母宿主細胞の適切なマーカーは、ADE2、HIS3、LEU2、LYS2、MET3、TRP1、およびURA3である。

【0199】

糸状真菌宿主細胞で使用するための選択可能なマーカーは、これに限定されるわけではないが、*amdS* (アセトアミダーゼ)、*argB* (オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ)、*bar* (ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ)、*hph* (ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ)、*niaD* (ニトレートレダクターゼ)、*pyrG* (オロチジン - 5' - リン酸デカルボキシラーゼ)、*sC* (硫酸アデニルトランスフェラーゼ)、および *trpC* (アントラニル酸合成酵素) はもちろんのこと、その同等物も含む。*Aspergillus* 細胞で使用するための実施形態は、*Aspergillus nidulans* または *Aspergillus oryzae* の *amdS* および *pyrG* 遺伝子ならびに *Streptomyces hygroscopicus* の *bar* 遺伝子を含む。

10

【0200】

本発明の発現ベクターは、宿主細胞ゲノムへのベクターの組み込またはゲノムとは無関係の細胞内でのベクターの自己複製を可能にする要素を含有できる。宿主細胞ゲノムへの組み込では、ベクターは、相同または非相同組み換えによるゲノム内へのベクターの組み込のためにベクターのポリペプチドまたはその他の要素をコードする核酸配列に依存し得る。

【0201】

または、発現ベクターは、宿主細胞のゲノム内への相同組み換えによる組み込を指示するためのさらなる核酸配列を含有することができる。さらなる核酸配列によって、ベクターの宿主細胞ゲノム内で染色体の正確な位置への組み込が可能となる。正確な位置に組み込まれる可能性を上昇させるために、組み込要素は好ましくは、相同組み換えの確率を上昇させるために対応する標的配列と高度に相同性である、100 ~ 10,000 個の塩基対、好ましくは 400 ~ 10,000 個の塩基対、最も好ましくは 800 ~ 10,000 個の塩基対などの十分な数の核酸を含有すべきである。組み込要素は、宿主細胞のゲノム内の標的配列と相同性である任意の配列であり得る。さらに組み込要素は、非コードまたはコード核酸配列であり得る。他方、ベクターは非相同組み換えによって宿主細胞のゲノム内に組み込まれ得る。

20

【0202】

自己複製では、ベクターは、ベクターが問題の宿主細胞内で自己複製できるようにする複製起点をさらに含むことができる。細菌複製起点の例は、*P15A ori* またはプラスミド *pBR322*、*pUC19*、*pACYC177* (プラスミドが *P15A ori* を有する)、もしくは *E. coli* における増幅を可能にする *pACYC184*、および *Bacillus* での増幅を可能にする *pUB110*、*pE194*、*pTA1060*、または *pAM* 1 の複製起点である。酵母宿主細胞で使用する複製起点の例は、2 ミクロン複製起点、*ARS1*、*ARS4*、*ARS1* および *CEN3* の組み合わせ、ならびに *ARS4* および *CEN6* の組み合わせである。複製起点は、宿主細胞中でその機能を温度感受性にする変異を有する複製起点であり得る (例えば、*Ehrlich*, 1978, *Proc Natl Acad Sci. USA* 75:1433 を参照)。

30

【0203】

本発明の核酸配列の1つ以上のコピーは、遺伝子産物の生成を増加するために宿主細胞内に挿入され得る。核酸配列のコピー数は、配列の少なくとも1つのさらなるコピーを宿主細胞ゲノムに組み込むことによって、または増幅可能な選択可能マーカー遺伝子を細胞が選択可能マーカー遺伝子の増幅されたコピーを含有する核酸配列と共に含めることによって増加させることができ、それにより核酸配列のさらなるコピーは、適切な選択可能因子の存在下で細胞を培養するために選択できる。

40

【0204】

本開示で使用する発現ベクターの多くは市販されている。適切な市販発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞における発現のための *CMV* プロモータおよび *hGH* ポリアデニル化部位ならびに *pBR322* 複製起点および *E. coli* における増幅のためのアンピシリン耐性マーカーを含む、*Sigma-Aldrich Chemicals*, *St. Lou*

50

is MO. による p3xFLAGTM (商標) 発現ベクターを含む。他の適切な発現ベクターは、Stratagene、LaJolla CAより市販されている pBlue script II SK (-) および pBK-CMV、ならびに pBR322 (Gibco BRL)、pUC (Gibco BRL)、pREP4、pCEP4 (Invitrogen) または pPoly (Lathera、1987、Gene 57、193-201) に由来するプラスミドである。

ケトレダクターゼポリペプチド発現のための宿主細胞

別の態様において、本開示は、本開示の改良ケトレダクターゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を提供し、ポリペプチドは宿主細胞でのケトレダクターゼ酵素の発現のための1つ以上の制御配列に操作可能に連結されている。本発明の発現ベクターによってコードされる KRED ポリペプチドを発現するのに使用される宿主細胞は、当分野で周知であり、これに限定されるわけではないが、細菌細胞、例えば、E. coli、Lactobacillus kefir、Lactobacillus brevis、Lactobacillus minor、Streptomyces および Salmonella typhimurium 細胞；真菌細胞、例えば、酵母細胞（例えば、Saccharomyces cerevisiae または Pichia pastoris (ATCC アクセッション番号 201178)）；昆虫細胞、例えば、ショウジョウバエ S2 および ヨトウ Sf9 細胞；動物細胞、例えば、CHO、COS、BHK、293、および Bowes 黒色腫細胞；ならびに植物細胞を含む。上述の宿主細胞に適切な培地および増殖条件は当分野で周知である。

【0205】

ケトレダクターゼの発現のためのポリヌクレオチドは、当分野で公知の各種の方法によって細胞内に導入され得る。技法は特に、電気穿孔、微粒子銃、リボソーム媒介トランスフェクション、塩化カルシウムトランスフェクション、および原形質体融合を含む。ポリヌクレオチドを細胞内に導入するための各種の方法は、当業者に明らかになるであろう。

【0206】

例示的な宿主細胞は、Escherichia coli W3110 である。発現ベクターは、改良ケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチドを、lacI リプレッサの制御下で lac プロモータに操作可能に連結されたプラスミド pCK110900 内に操作可能に連結することによって作製した。発現ベクターは、P15a 複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含有していた。Escherichia coli W3110 内に主題のポリヌクレオチドを含有する細胞は、細胞にクロラムフェニコール選択を受けさせることによって単離できる。

改変ケトレダクターゼポリペプチドを産生する方法

いくつかの実施形態において、本開示の改良 KRED ポリヌクレオチドおよびポリペプチドを作製するために、還元反応を触媒する天然に存在するケトレダクターゼ酵素は、Lactobacillus kefir、Lactobacillus brevis または Lactobacillus minor より得た（または由来する）。いくつかの実施形態において、親ポリヌクレオチド配列は、規定された宿主細胞におけるケトレダクターゼの発現を増強するためにコドン最適化される。例として、Lactobacillus kefir の野生種 KRED ポリペプチドをコードする親ポリヌクレオチド配列は、Genbank データベースで入手可能な Lactobacillus kefir KRED の公知のポリペプチド配列（Genbank アクセッション番号 AAP94029 GI: 33112056）に基づいて調製されたオリゴヌクレオチドから作製した。配列番号3と呼ばれる親ポリヌクレオチド配列は E. coli での発現のためにコドン最適化し、コドン最適化したポリヌクレオチドを発現ベクター内にクローニングして、lac プロモータおよび lacI リプレッサ遺伝子の制御下でケトレダクターゼ遺伝子を発現させた。E. coli において活性ケトレダクターゼを発現するクローンを同定し、遺伝子を配列決定してその同一性を確認した。指定された配列（配列番号3）は、Lactobacillus kefir ケトレダクターゼから進化した改変ケトレダクターゼの大

半の実験の起始点およびライブラリ構築として利用される親配列であった。

【0207】

改変ケトレダクターゼは、上述したように、天然に存在するケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチドに突然変異誘発および/または定方向進化法を受けさせることによって得られる。例示的な定方向進化技法は、Stemmer, 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91:10747-10751; WO 95/22625; WO 97/0078; WO 97/35966; WO 98/27230; WO 00/42651; WO 01/75767および米国特許第6,537,746号に記載されているような突然変異誘発および/またはDNAシャッフリングである。利用できる他の定方向進化手順は、特にねじれ形伸長プロセス(StEP)、インビトロ組み換え(Zhaoら、1998, Nat. Biotechnol. 16:258-261)、突然変異誘発PCR(Caldwellら、1994, PCR Methods Appl 1.3:S136-S140)、およびカセット突然変異誘発(Blackら、1996, Proc Natl Acad Sci USA 93:3525-3529)を含む。本明細書の目的に有用なさらなる突然変異誘発および定方向進化は、次の文献に見出すことができる: Lingら、1997, "Approaches to DNA mutagenesis: an overview," Anal. Biochem. 254(2):157-78; Daleら、1996, "Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method," Methods Mol. Biol. 57:369-74; Smith, 1985, "In vitro mutagenesis," Ann. Rev. Genet. 19:423-462; Botsteinら、1985, "Strategies and applications of in vitro mutagenesis," Science 229:1193-1201; Carter, 1986, "Site-directed mutagenesis," Biochem. J. 237:1-7; Kramerら、1984, "Point Mismatch Repair," Cell, 38:879-887; Wellsら、1985, "Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites," Gene 34:315-323; Minshullら、1999, "Protein evolution by molecular breeding," Curr Opin Chem Biol 3:284-290; Christiansら、1999, "Directed evolution of thymidine kinase for AZT phosphorylation using DNA family shuffling," Nature Biotech 17:259-264; Cramerら、1998, "DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution," Nature 391:288-291; Cramerら、1997, "Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling," Nature Biotech 15:436-438; Zhangら、1997, "Directed evolution of an effective fructosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening," Proc Natl Acad Sci USA 94:45-4-4509; Cramerら、1996, "Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling," Nature Biotech 14:315-319; および Stemmer, 1994, "Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling," Nat

10

20

30

40

50

ure 370:389-391。すべての刊行物は参照により本明細書に組入れられている。

【0208】

突然変異誘発処理後に得たクローンは、所望の改良酵素特性を有する改変ケトレダクターゼについてスクリーニングする。発現ライブラリからの酵素活性の測定は、それがNAD⁺またはNADP⁺に変換されるときにNADHまたはNADPH濃度の低下率（吸収または蛍光の低下による）を監視する標準生化学技法を使用して実施できる（例えば、実施例7を参照）。この反応では、ケトレダクターゼがケトン基質を対応するヒドロキシル基に還元するときに、NADHまたはNADPHはケトレダクターゼによって消費（酸化）される。単位時間当りの吸収または蛍光の低下によって測定されるようなNADHまたはNADPH濃度の低下率は、固定量の溶解液（またはそれから作製した凍結乾燥粉末）中でのKREDポリペプチドの相対（酵素）活性を示す。生成物の空間的配置は各種の公知の技法によって、実施例で与えられているように確認できる。所望の改良酵素特性が熱安定性である場合、酵素活性は、酵素調製物を所定の温度にさらした後に測定でき、熱処理後に残存する酵素活性の量を測定する。ケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチドを含有するクローンを次に単離し、配列決定してヌクレオチド配列の変化（存在する場合）を同定し、宿主細胞中で酵素を発現するために使用する。

10

【0209】

改変ポリペプチドの配列が公知である場合、酵素をコードするポリヌクレオチドは、公知の合成方法に従って標準固相方法によって調製できる。いくつかの実施形態において、約100塩基までの断片を個別に合成し、次に（例えば、酵素もしくは化学連結、またはポリメラーゼ媒介方法によって）結合して任意の所望の連続配列を形成できる。例えば、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、例えば、Beaucageら、1981, Tet Lett 22:1859-69に記載された古典的なホスホラミダイト法、または例えば、自動合成法で通例実施されるような、Matthewsら、1984, EMBO J. 3:801-05に記載された方法を使用する化学合成によって調製できる。ホスホラミダイト法により、オリゴヌクレオチドを例えば、自動DNA合成装置で合成して、精製し、アニーリングして、適切なベクター中に連結およびクローニングする。さらに本質的にどの核酸もThe Midland Certified Reagent Company, Midland, TX, The Great American Gene Company, Ramona, CA, Express Gen Inc., Chicago, IL, Operon Technologies Inc., Alameda, CA、およびその他多数などの各種の市販元のいずれからでも入手できる。

20

30

【0210】

宿主細胞で発現した改変ケトレダクターゼ酵素は、特にリゾチーム処理、超音波処理、濾過、塩析出、超遠心分離、およびクロマトグラフィーを含む、タンパク質精製の周知の技法のいずれか1つ以上を使用して細胞または培地から回収できる。E. coliなどの細菌からのタンパク質の溶解および高効率抽出のための好適な溶液は、St. Louis MO.のSigma-Aldrichから商標名Cellytic B（商標）で市販されている。

40

【0211】

ケトレダクターゼポリペプチドの単離のためのクロマトグラフィー技法は特に、逆相クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、およびアフィニティクロマトグラフィーを含む。特定の酵素を精製するための条件は、一部は正味電荷、疎水性、親水性、分子量、分子形状などの因子によって変わるであろうし、当業者に明らかとなるであろう。

【0212】

いくつかの実施形態において、アフィニティ技法を使用して改良ケトレダクターゼ酵素が分離され得る。アフィニティクロマトグラフィー精製では、ケトレダクターゼポリペプチドに特異的に結合する任意の抗体が使用され得る。抗体の生成では、これに限定される

50

わけではないが、ウサギ、マウス、ラットなどを含む各種の宿主動物がケトレダクターゼ注射によって免疫化され得る。ケトレダクターゼポリペプチドは、側鎖官能基または側鎖官能基に結合されたリンカーによって、B S Aなどの好適な担体に結合され得る。これに限定されるわけではないが、フロイント（完全または不完全）、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油性エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、ならびにB C G（バチルスカルメットゲラン）およびC o r y n e b a c t e r i u m p a r v u mなどの潜在的に有用なヒトアジュバントを含む各種のアジュバントが、宿主種に応じて、免疫応答を上昇させるために使用され得る。

【0213】

10

ケトレダクターゼは、酵素を発現する細胞の形で、粗抽出物として、または単離もしくは精製調製物として調製および使用され得る。ケトレダクターゼは、凍結乾燥物として、粉末形（例えば、アセトン粉末）で調製され得るか、または酵素溶液として調製され得る。いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼは実質的に純粋な調製物の形であり得る。

【0214】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼポリペプチドは固体基質に結合できる。基質は固相、表面、および/または膜であり得る。固体支持体は、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフルオロエチレン、ポリエチレンオキシ、およびポリアクリルアミドなどの有機ポリマーはもちろんのこと、そのコポリマーおよびグラフトによっても構成できる。固体支持体は、ガラス、シリカ、孔径制御ガラス（C P G）、逆相シリカまたは金もしくは白金などの金属でもあり得る。基質の配置はビーズ、球、粒子、顆粒、ゲル、膜または表面の形であり得る。表面は、平面、実質的に平面、または非平面であり得る。固体支持体は多孔性または非多孔性であり、膨潤または非膨潤特徴を有することができる。固体支持体は、ウェル、くぼみ、または他のコンテナ、容器、機構、もしくは位置の形で構成され得る。試薬のロボット送達で、または検出方法および/または器具によって処置できるように、複数の支持体をアレイとして各種の位置に構成できる。

20

改変ケトレダクターゼ酵素の使用法およびそれを用いて調製した化合物

本明細書に記載するケトレダクターゼ酵素は、3'、4'、および5'位の1つ以上において場合により置換された2'、6'置換アセトフェノン基質におけるケト基の、対応

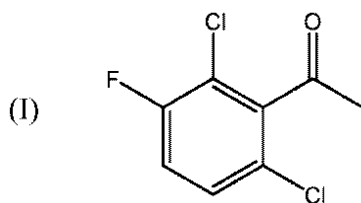
30

【0215】

いくつかの実施形態において、ケトレダクターゼは、構造式(I)の基質化合物(2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン)を

【0216】

【化5】

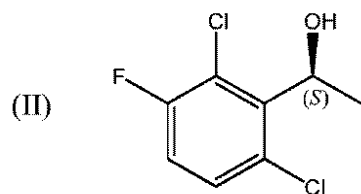


40

構造式(II)の対応するキラルアルコール生成物、(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに還元または変換することができる。

【0217】

【化 6】

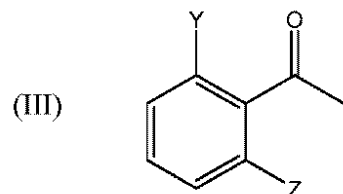


いくつかの実施形態において、本明細書に記載するケトレダクターゼは、構造式 (I I I) の 2', 6' - 置換アセトフェノン化合物

【 0 2 1 8 】

10

【化 7】

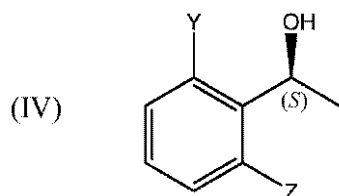


(式中、YおよびZは、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 OH 、 OCH_3 、 Cl 、および Br から独立して選択される)を構造式 (I V) の対応するキラルアルコール生成物に還元または変換できる。

20

【 0 2 1 9 】

【化 8】

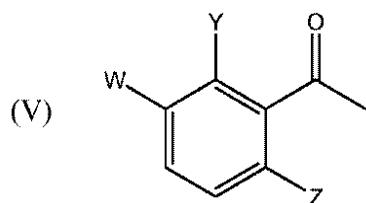


いくつかの実施形態において、本明細書に記載するケトレダクターゼは、3'、4'、および5'位の1つ以上において同様に置換可能である、構造式 (I I I) の 2', 6' - 置換アセトフェノン化合物の、対応する (S) - アルコール生成物への還元反応を触媒できる。アセトフェノンに加えて、特異的なさらに置換された 2', 6' - 置換アセトフェノン化合物の還元反応を触媒する、本明細書に記載するケトレダクターゼの能力は、日常的な実験によって、例えば、実施例に記載したような方法によって決定できる。構造式 (I) の化合物 2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンは、さらに置換された 2', 6' - 置換アセトフェノン化合物の一例である。したがって、いくつかの実施形態において、本明細書で開示するケトレダクターゼ酵素は、構造式 (V) の化合物

30

【 0 2 2 0 】

【化 9】

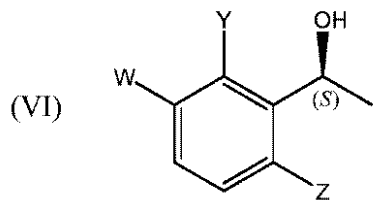


40

(式中、YおよびZは、 CH_3 、 CF_3 、 NH_2 、 OH 、 OCH_3 、 Cl 、および Br から独立して選択され、Wは、HまたはF、 Cl 、もしくは Br から選択される)の、構造式 (I V) の対応する (S) アルコール生成物への還元反応を触媒できる。

【 0 2 2 1 】

【化 10】



それゆえ、いくつかの実施形態において、本明細書に記載したケトレダクターゼは、3'、4'、または5'位の1つ以上で場合により置換された2'，6'置換アセトフェノン基質を対応する置換(S)-フェネタノールに還元する方法で使用可能であり、該方法は、置換アセトフェノン基質を本明細書に記載するケトレダクターゼと接触させるステップを含む。この方法のいくつかの実施形態において、基質は約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または99.9%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。

【0222】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載したケトレダクターゼは、式(III)の2'，6'-置換アセトフェノン基質を式(IV)の対応する置換(S)-フェネタノール化合物に還元する方法で使用することが可能であり、該方法は、式(III)の化合物を式(IV)の対応する置換(S)-フェネタノール化合物に還元または変換するのに好適な反応条件下で、式(III)の化合物を本明細書に記載するケトレダクターゼと接触またはインキュベートさせるステップを含む。この方法のいくつかの実施形態において、基質は約25%、50%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または99.9%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。

【0223】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するケトレダクターゼは、式(I)の2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質を式(II)のその対応する(S)-アルコール生成物、(S)-1-(2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル)-エタノールに還元する方法で使用することが可能であり、該方法は、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを(S)-1-[2,6-ジクロロ-3-フルオロフェニル]-エタノールに還元または変換するのに好適な反応条件下で、2'，6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを本明細書に記載するケトレダクターゼポリペプチドと接触またはインキュベートするステップを含む。いくつかの実施形態において、基質は約85%、90%、95%、99%、または99.9%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。いくつかの実施形態において、基質は約85%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元され、ここで、ケトレダクターゼポリペプチドは配列番号95、96または119の配列式に基づくアミノ酸配列を含む。

【0224】

いくつかの実施形態において、野生型*Lactobacillus*種ケトレダクターゼ酵素に由来する改変(S)-選択性ケトレダクターゼ酵素は、約85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.9%またはそれ以上よりも大きい立体異性体過剰率でアセトフェノンを(S)-1-フェネタノールに還元する方法で使用できる。

【0225】

いくつかの実施形態において、基質は約99%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元され、該方法に使用されるケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号6、8、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および94から選択されるアミノ酸配列を含む。本方法のいくつかの実施形態にお

いて、該方法が 2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノン基質の量に対して約 1 重量%未満の量でケトレダクターゼポリペプチドを用いて実施されるとき、基質の少なくとも約 95%が 24 時間未満で約 99%を超える立体異性体過剰率で生成物に還元される。

【0226】

方法のいくつかの実施形態において、該方法が少なくとも約 200 g/L の基質および約 1 g/L 未満のケトレダクターゼポリペプチドを用いて実施されるとき、基質の少なくとも約 95%が 24 時間未満で少なくとも約 99%の立体異性体過剰率で生成物に還元され、該方法に使用されるケトレダクターゼポリペプチドは、配列番号 18、32、34、36、38、40、42、44、46、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、および 94 から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【0227】

いくつかの実施形態において、本開示のケトレダクターゼポリペプチドおよび方法は、WO 2006021886 (アミノヘテロアリール化合物)、WO 2006021884 (エナンチオマー的に実質的に純粋なアミノヘテロアリール化合物)、WO 2006021881 (ピラゾール置換アミノヘテロアリール化合物)、および WO 2004076412 (アミノヘテロアリール化合物) に記載されているプロテインチロシンキナーゼ阻害化合物の合成に使用可能であり、その合成は中間体としての式 (VII) の化合物に依存している。すべての参考文献は、その全体が参照により本明細書に組み入れられている。

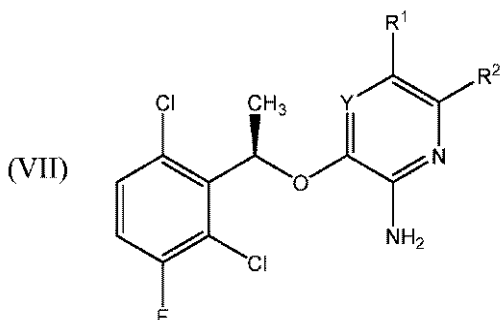
20

【0228】

したがって、いくつかの実施形態において、本明細書に記載するケトレダクターゼポリペプチドおよび方法は、構造式 (VII) のプロテインチロシンキナーゼ阻害薬

【0229】

【化 11】



30

(その塩、水和物、および溶媒和物を含む)を、参考文献 WO 04076412 および WO 06021884 に記載されているように生成するのに使用可能であり、式中、 R^1 、 R^2 、Y および N はそこで記載されている通りである。いくつかの実施形態において、式 (VII) の化合物では、

Y は、N または CR^{12} であり；

R^1 は、水素、ハロゲン、 C_{6-12} アリール、5 ~ 12 員ヘテロアリール、 C_{3-12} シクロアルキル、3 ~ 12 員ヘテロ脂環式、 $-O(CR^6R^7)_nR^4$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-C(O)OR^4$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-C(O)NR^4R^5$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-C(=NR^6)NR^4R^5$ 、 C_{1-8} アルキル、 C_{2-8} アルケニル、および C_{2-8} アルキニルより選択され；ならびに R^1 の各水素は、1 つ以上の R^3 基によって場合により置換され；

40

R^2 は、水素、ハロゲン、 C_{1-2} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3 ~ 12 員ヘテロ脂環式、5 ~ 12 員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-O(CR^6R^7)_nR^4$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)OR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nNCR^4R^5$ 、 $-C(=NR^6)NR^4R^5$ 、 $-N$

50

$R^4 C(O)NR^5R^6$ 、 $-NR^4S(O)_pR^5$ または $-C(O)NR^4R^5$ であり、 R^2 の各水素は、 R^8 によって場合により置換され；

各 R^3 は独立して、ハロゲン、 C_{1-2} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-O(CR^6R^7)_nR^4$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)OR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nNCR^4R^5$ 、 $-C(=NR^6)NR^4R^5$ 、 $-NR^4C(O)NR^5R^6$ 、 $-NR^4S(O)_pR^5$ または $-C(O)NR^4R^5$ であり、 R^3 の各水素は、 R^8 によって場合により置換され、隣接原子の R^3 基は一緒になって、 C_{6-12} アリール、5～12員ヘテロアリール、 C_{3-12} シクロアルキルまたは3～12員ヘテロ脂環式基を形成してもよく；

各 R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 は独立して、水素、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリールであり；または同じ窒素原子に結合した R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 のいずれか2つが、それらが結合した窒素と一緒にあって、N、O、およびSより選択される1～3個のさらなるヘテロ原子を場合により含有する3～12員ヘテロ脂環式もしくは5～12員ヘテロアリール基を形成してもよく；または同じ炭素原子に結合した R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 のいずれか2つが一緒になって、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式または5～12員ヘテロアリール基を形成してもよく； R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 の各水素は、 R^8 によって場合により置換され；

各 R^8 は独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-NH_2$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-12}$ アルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{3-12}$ シクロアルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{6-12}$ アリール、 $-O-(CH_2)_n$ (3～12員ヘテロ脂環式) または $-O-(CH_2)_n$ (5～12員ヘテロアリール) であり； R^8 の各水素は、 R^{11} によって場合により置換され；

各 R^9 および R^{10} は独立して、水素、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)OR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nNCR^4R^5$ 、 $-NR^4C(O)NR^5R^6$ 、 $-NR^4S(O)_pR^5$ または $-C(O)NR^4R^5$ であり； R^9 または R^{10} は、Aの環原子またはAの置換基と一緒にあって、Aに縮合した C_{3-12} シクロアルキル、3～12員ヘテロ脂環式、 C_{6-12} アリールまたは5～12員ヘテロアリール環を形成してもよく； R^9 または R^{10} の各水素は、 R^3 によって場合により置換され；

各 R^{11} は独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{1-12} アルコキシ、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-O-C_{1-12}$ アルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{3-12}$ シクロアルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{6-12}$ アリール、 $-O-(CH_2)_n$ (3～12員ヘテロ脂環式)、 $-O-(CH_2)_n$ (5～12員ヘテロアリール) または $-CN$ であり、 R^{11} の各水素は、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-CN$ 、部分的または完全にハロゲン化され得る $-C^{1-12}$ アルキル、部分的または完全にハロゲン化され得る $-O-C_{1-12}$ アルキル、 $-CO$ 、 $-SO$ または $-SO_2$ によって場合により置換され；

R^{12} は、水素、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2O$

10

20

30

40

50

R^4 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{OR}^4$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{O}(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{R}^4$ 、 $-\text{NR}^4\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{NCR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^6)\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{NR}^4\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{NR}^4\text{S}(\text{O})_p\text{R}^5$ または $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$ であり、 R^{12} の各水素は、 R^3 によって場合により置換され；

各 R^{13} は独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-\text{S}(\text{O})_m\text{R}^4$ 、 $-\text{SO}^2\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{OR}^4$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{OR}^4$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}^4$ 、 $-\text{O}(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{R}^4$ 、 $-\text{NR}^4\text{C}(\text{O})\text{R}^5$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{C}(\text{O})\text{OR}^4$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{OR}^4$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{NCR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(=\text{NR}^6)\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $-\text{NR}^4\text{C}(\text{O})\text{NR}^5\text{R}^6$ 、 $-\text{NR}^4\text{S}(\text{O})_p\text{R}^5$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$ 、 $(\text{CR}^6\text{R}^7)_n$ (3～12員ヘテロ脂環式)、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n$ (C_{3-12} シクロアルキル)、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n$ (C_{6-12} アリール)、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n$ (5～12員ヘテロアリール)、 $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{C}(\text{O})\text{NR}^4\text{R}^5$ 、または $-(\text{CR}^6\text{R}^7)_n\text{C}(\text{O})\text{R}^4$ であり、隣接原子の R^{13} 基は一緒になって、 C_{6-12} アリール、5～12員ヘテロアリール、 C_{3-12} シクロアルキルまたは3～12員ヘテロ脂環式基を形成してもよく、 R^{13} の各水素は、 R^3 によって場合により置換され；

式中、各 m は独立して、0、1または2であり；各 n は独立して、0、1、2、3または4であり；各 p は独立して、1または2である。式(VII)に含まれる具体的な化合物と同様に各種の置換基の説明は、WO 04076412およびWO 06021884に記載されている。

【0230】

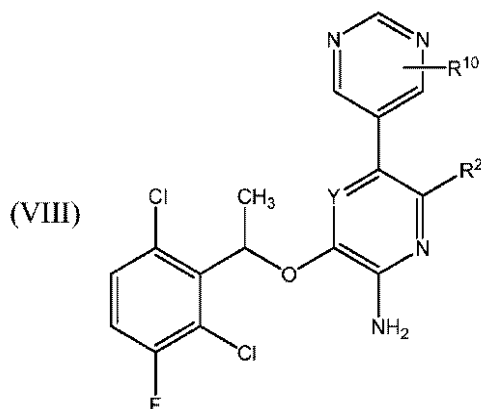
したがって、構造式(VII)のエナンチオマー的に純粋な化合物を生成する方法において、方法のステップは、式(I)の基質化合物を式(II)の生成物化合物に還元または変換するのに好適な反応条件下で本明細書に記載するケトレダクターゼポリペプチドを使用して、式(I)の化合物を式(II)の化合物に還元または変換することを含むことができる。式(II)の化合物からの式(VII)の化合物の合成は、引用した参考文献に記載されている。

【0231】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載するケトレダクターゼポリペプチドおよび方法は、構造式(VIII)のプロテインチロシンナーゼ阻害薬

【0232】

【化12】



(その塩、水和物、および溶媒和物を含む)を、WO 06021886に記載されているように生成するのに使用可能であり、式中、 R^{10} 、 R^2 、 Y および N はそこで記載されている通りである。いくつかの実施形態において、式(VIII)の化合物では、

Y は、N または CR^1 であり；

R^1 は、水素、ハロゲン、 C_{1-2} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-O(CR^6R^7)_nR^4$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)OR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nNCR^4R^5$ 、 $-C(=NR_6)NR^4R^5$ 、 $-NR^4C(O)NR^5R^6$ 、 $-NR^4S(O)_pR^5$ または $-C(O)NR^4R^5$ であり、 R^1 の各水素は、 R^3 によって場合により置換され；

R^2 は、水素、ハロゲン、 C_{1-2} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-O(CR^6R^7)_nR^4$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)OR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nNCR^4R^5$ 、 $-C(=NR_6)NR^4R^5$ 、 $-NR^4C(O)NR^5R^6$ 、 $-NR^4S(O)_pR^5$ または $-C(O)NR^4R^5$ であり、 R^2 の各水素は、 R^8 によって場合により置換され；

各 R^3 は独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-S(O)_mR^4$ 、 $-SO_2NR^4R^5$ 、 $-S(O)_2OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-O(CR^6R^7)_nR^4$ 、 $-NR^4C(O)R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)OR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nOR^4$ 、 $-(CR^6R^7)_nC(O)NR^4R^5$ 、 $-(CR^6R^7)_nNCR^4R^5$ 、 $-C(=NR_6)NR^4R^5$ 、 $-NR^4C(O)NR^5R^6$ 、 $-NR^4S(O)_pR^5$ または $-C(O)NR^4R^5$ であり、 R^3 の各水素は、 R^8 によって場合により置換され、隣接原子の R^3 基は一緒になって、 C_{6-12} アリール、5～12員ヘテロアリール、 C_{3-12} シクロアルキルまたは3～12員ヘテロ脂環式基を形成してもよく；

各 R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 は独立して、水素、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリールであるか；または同じ窒素原子に結合した R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 のいずれか2つがそれらが結合した窒素と一緒にあって、N、O、およびSより選択される1～3個のさらなるヘテロ原子を場合により含有する3～12員ヘテロ脂環式もしくは5～12員ヘテロアリール基を形成してもよく；または同じ炭素原子に結合した R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 のいずれか2つが一緒になって、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式または5～12員ヘテロアリール基を形成してもよく； R^4 、 R^5 、 R^6 および R^7 の各水素は、 R^8 によって場合により置換され；

各 R^8 は独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-NH_2$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-O-C_{1-12}$ アルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{3-12}$ シクロアルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{6-12}$ アリール、 $-O-(CH_2)_n$ (3～12員ヘテロ脂環式) または $-O-(CH_2)_n$ (5～12員ヘテロアリール) であり； R^8 の各水素は、 R^9 によって場合により置換され；

各 R^9 は独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{1-12} アルコキシ、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3～12員ヘテロ脂環式、5～12員ヘテロアリール、 $-O-C_{1-12}$ アルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{3-12}$ シクロアルキル、 $-O-(CH_2)_nC_{6-12}$ アリール、 $-O-(CH_2)_n$ (3～12員ヘテロ脂環式)、 $-O-(CH_2)_n$ (5～12員ヘテロアリール) または $-CN$ であり、 R^9 の各水素は、ハロゲン、 $-OH$ 、 $-CN$ 、部分的または完全にハロゲン化され得る $-C^{1-12}$ ア

10

20

30

40

50

ルキル、部分的または完全にハロゲン化され得る $-O-C_{1-12}$ アルキル、 $-CO$ 、 $-SO$ または $-SO_2$ によって場合により置換され；

R^{10} は、1、2 または 3 個の任意の置換基、独立して、ハロゲン、 C_{1-12} アルキル、 C_{2-12} アルケニル、 C_{2-12} アルキニル、 C_{3-12} シクロアルキル、 C_{6-12} アリール、3 ~ 12 員ヘテロ脂環式、5 ~ 12 員ヘテロアリール、 $-S(O)_m R^4$ 、 $-SO_2 NR^4 R^5$ 、 $-S(O)_2 OR^4$ 、 $-NO_2$ 、 $-NR^4 R^5$ 、 $-(CR^6 R^7)_n OR^4$ 、 $-CN$ 、 $-C(O)R^4$ 、 $-OC(O)R^4$ 、 $-O(CR^6 R^7)_n R^4$ 、 $-NR^4 C(O)R^5$ 、 $-(CR^6 R^7)_n C(O)OR^4$ 、 $-(CR^6 R^7)_n OR^4$ 、 $-(CR^6 R^7)_n C(O)NR^4 R^5$ 、 $-(CR^6 R^7)_n NCR^4 R^5$ 、 $-C(=NR^6)NR^4 R^5$ 、 $-NR^4 C(O)NR^5 R^6$ 、 $-NR^4 S(O)_p R^5$ 、 $-C(O)NR^4 R^5$ 、 $(CR^6 R^7)_n$ (3 ~ 12 員ヘテロ脂環式)、 $-(CR^6 R^7)_n$ (C_{3-12} シクロアルキル)、 $-(CR^6 R^7)_n$ (C_{6-12} アリール)、 $-(CR^6 R^7)_n$ (5 ~ 12 員ヘテロアリール)、または $-(CR^6 R^7)_n C(O)NR^4 R^5$ を表し、 R^{10} の各水素は、 R^3 によって場合により置換され；

式中、各 m は独立して、0、1 または 2 であり；各 n は独立して、0、1、2、3 または 4 であり；各 p は独立して、1 または 2 である。式 (VII) に含まれる具体的な化合物と同様に各種の置換基の説明は、WO 0 6 0 2 1 8 8 6 に記載されている。

【0233】

したがって、構造式 (VII) の化合物を生成する方法において、方法のステップは、式 (I) の基質化合物を式 (II) の生成物化合物に還元または変換するのに好適な反応条件下で本明細書に記載するケトレダクターゼポリペプチドを使用して、式 (I) の化合物を式 (II) の化合物に還元または変換することを含むことができる。式 (II) の化合物からの式 (VII) の化合物の合成は、引用した参考文献に記載されている。

【0234】

当業者には公知であるように、ケトレダクターゼ触媒還元反応は、代表的に補因子を必要とする。本明細書に記載する操作されたケトレダクターゼ酵素によって触媒される還元反応も代表的に補因子を必要とするが、本操作されたケトレダクターゼの多くの実施形態は、野生型ケトレダクターゼ酵素で触媒される反応よりはるかに少ない補因子しか必要としない。本明細書において用いる場合、用語「補因子」は、ケトレダクターゼ酵素との組み合わせで動作する非タンパク質化合物を指す。本明細書に記載する操作されたケトレダクターゼ酵素と共に使用するために適する補因子としては、 $NADP^+$ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸)、 $NADPH$ ($NADP^+$ の還元形)、 NAD^+ (ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) および $NADH$ (NAD^+ の還元形) が挙げられるが、これらに限定されない。一般に、前記補因子の還元形を反応混合物に添加する。前記還元 $NAD(P)H$ 形は、場合によっては、補因子再生系を使用してその酸化 $NAD(P)^+$ 形から再生させることができる。

【0235】

用語「補因子再生系」は、補因子の酸化形を還元する反応 (例えば、 $NADP^+$ から $NADPH$) に関与する 1 セットの反応物を指す。ケト基質のケトレダクターゼ触媒還元によって酸化された補因子は、補因子再生系によって還元形に再生される。補因子再生系は、還元性水素等価物の源であり、且つ、その補因子の酸化形を還元できる、化学量論的量の還元剤を含む。補因子再生系は、その還元剤によるその補因子の酸化形の還元を触媒する触媒、例えば酵素触媒、をさらに含み得る。 NAD^+ または $NADP^+$ からそれぞれ $NADH$ または $NADPH$ を再生するための補因子再生系は、当該技術分野において公知であり、本明細書に記載する方法においてそれらを使用することができる。

【0236】

利用することができる、適する例示的補因子再生系としては、グルコースおよびグルコースデヒドロゲナーゼ、ホルマー脱およびギ酸デヒドロゲナーゼ、グルコース - 6 - リン酸塩およびグルコース - 6 - リン酸デヒドロゲナーゼ、第二級 (例えば、イソプロパノール) アルコールおよび第二級アルコールデヒドロゲナーゼ、亜リン酸塩および亜リン酸デ

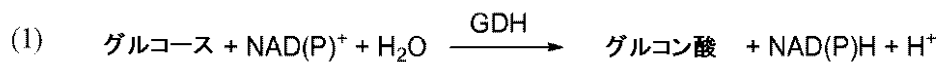
ヒドロゲナーゼ、分子水素およびヒドロゲナーゼなどが挙げられるが、これらに限定されない。これらの系を、補因子として $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$ または $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ いずれかと併用することができる。ヒドロゲナーゼを使用する電気化学的再生も、補因子再生系として用いることができる。例えば、米国特許第 5,538,867 号および同第 6,495,023 号参照（これらの両方が参照により本明細書に援用されている）。金属触媒および還元剤（例えば、分子水素またはホルマート）を含む化学的補因子再生系も適する。例えば、PCT 公報 WO 2000/053731 参照（これは参照により本明細書に援用されている）。

【0237】

用語「グルコースデヒドロゲナーゼ」および「GDH」は、グルコン酸および NADH または NADPH への D-グルコースおよび NAD^+ または NADP^+ の変換をそれぞれ触媒する、 NAD^+ または NADP^+ 依存性酵素を指すために本明細書では交換可能に用いている。下の反応式 (1) は、グルコースによる NAD^+ または NADP^+ のグルコースデヒドロゲナーゼ触媒還元を説明する。

【0238】

【化13】



本明細書に記載する方法の実施の際の使用に適するグルコースデヒドロゲナーゼは、天然由来グルコースデヒドロゲナーゼと非天然由来グルコースデヒドロゲナーゼの両方を含む。天然由来グルコースデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子は、文献に報告されている。例えば、*Bacillus subtilis* 61297 GDH 遺伝子が、*E. coli* において発現され、そしてその天然宿主において生産された酵素と同じ物理化学的性質を示すと報告されている (Vasanthara, 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:785)。GenBank アクセッション番号 M12276 に対応する *B. subtilis* GDH 遺伝子の遺伝子配列は、Lampel ら, 1986, J. Bacteriol. 166:238~243 により報告されており、そして補正された形のもは、GenBank アクセッション番号 D50453 として Yamane ら, 1996, Microbiology 142:3047~3056 により報告されている。天然由来の GDH 遺伝子は、*B. cereus* ATCC 14579 からの GDH をコードするもの (Nature, 2003, 423:87~91; GenBank アクセッション番号 AE017013) および *B. megaterium* からの GDH をコードするもの (Eur. J. Biochem., 1988, 174:485~490, GenBank アクセッション番号 X12370; J. Ferment. Bioeng., 1990, 70:363~369, GenBank アクセッション番号 GI216270) も含む。*Bacillus* 種からのグルコースデヒドロゲナーゼは、PCT 公報 WO 2005/018579 に、（その PCT 公報の配列番号 9 および 11 にそれぞれ対応するポリヌクレオチド配列によってコードされる）配列番号 10 および 12 として提供されており、その開示は参照により本明細書に援用される。

【0239】

非天然由来グルコースデヒドロゲナーゼは、例えば突然変異誘発、定方向進化などのような公知の方法を用いて生じさせることができる。天然由来であろうと、非天然由来であろうと、適する活性を有する GDH 酵素は、PCT 公報 WO 2005/018579 の実施例 4 に記載されているアッセイを用いて容易に同定することができ、その開示は参照により本明細書に援用される。例示的非天然由来グルコースデヒドロゲナーゼは、PCT 公報 WO 2005/018579 に配列番号 62、64、66、68、122、124、および 126 として提供されている。それらをコードするポリヌクレオチド配列は、PCT 公報 WO 2005/018579 に、それぞれ、配列番号 61、63、65、67、121、123、および 125 として提供されている。これらの配列のすべてが参照に

10

20

30

40

50

より本明細書に援用される。本明細書に開示するケトレダクターゼ触媒還元反応において使用するために適する追加の非天然由来グルコースデヒドロゲナーゼは、米国特許出願公開第2005/0095619号および同第2005/0153417号に提供されており、これらの開示は、参照により本明細書に援用される。

【0240】

本明細書に記載するケトレダクターゼ触媒還元反応に利用されるグルコースデヒドロゲナーゼは、PCT公報WO 2005/018579の実施例4に記載されているアッセイにおいて、少なくとも約 $10 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ の、および時として少なくとも約 $10^2 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ または約 $10^3 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ 、約 $10^4 \mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ まで、またはそれより高い活性を示すことができる。

10

【0241】

本明細書に記載するケトレダクターゼ触媒還元反応は、一般に、溶媒中で行われる。適する溶媒としては、水、有機溶媒（例えば、酢酸エチル、酢酸ブチル、1-オクタノール、ヘプタン、オクタン、メチル- α -ブチルエーテル（MTBE）、トルエンなど）、イオン性液体（例えば、テトラフルオロホウ酸1-エチル-4-メチルイミダゾリウム、テトラフルオロホウ酸1-ブチル-3-メチルイミダゾリウム、ヘキサフルオロリン酸1-ブチル-3-メチルイミダゾリウムなど）が挙げられる。一部の実施形態では、水および水性共溶媒系をはじめとする水性溶媒が、使用される。

【0242】

例示的水性共溶媒系は、水および1つ以上の有機溶媒を有する。一般に、水性共溶媒系の有機溶媒成分は、それがケトレダクターゼ酵素を完全には不活性化しないように選択される。適切な共溶媒系は、本明細書に記載するものなどの酵素活性アッセイを利用して、候補溶媒系中での対象となる規定された基質を用いて特定の操作されたケトレダクターゼ酵素の酵素活性を測定することによって、容易に特定することができる。

20

【0243】

水性共溶媒系の有機溶媒成分は、その水性成分と混和性であって、単一の液相を生じさせる場合もあり、またはその水性成分と部分混和性もしくは不混和性であって、2つの液相を生じさせる場合もある。一般に、水性共溶媒系を利用するときには、有機溶媒に分散された水、またはその逆で、二相性になるように選択する。一般に、水性共溶媒系を利用するときには、水相から容易に分離することができる有機溶媒を選択することが望ましい。一般に、前記共溶媒系中の水の有機溶媒に対する比率は、代表的に、有機溶媒対水 約90:10から約10:90（v/v）の範囲、および有機溶媒対水 80:20と20:80（v/v）の間である。前記共溶媒系は、反応混合物に添加する前に前もって形成される場合もあり、または反応容器内でインサイチュで形成される場合もある。

30

【0244】

水性溶媒（水または水性共溶媒系）は、pH緩衝されていても、緩衝されていなくてもよい。一般に、前記還元は、約10以下、通常は約5から約10の範囲のpHで行うことができる。一部の実施形態において、前記還元は、約9以下、通常は約5から約9の範囲のpHで行われる。一部の実施形態において、前記還元は、約8以下、多くの場合、約5から約8の範囲、および通常は約6から約8の範囲のpHで行われる。前記還元は、約7.8以下、または約7.5以下のpHで行われる場合もある。あるいは、前記還元は、中性pH、すなわち約7、で行われる場合がある。

40

【0245】

前記還元反応の過程で、反応混合物のpHが変わることがある。反応の過程で酸または塩基を添加することにより、その反応混合物のpHを所望のpHでまたは所望のpH範囲内で維持することができる。あるいは、緩衝剤を含む水性溶媒を使用することによって、pHを制御することができる。所望のpH範囲を維持するために適する緩衝剤は、当該技術分野において公知であり、それらとしては、例えば、リン酸緩衝液、トリエタノールアミン緩衝液などが挙げられる。緩衝と酸または塩基添加とを併用してもよい。

【0246】

50

グルコース／グルコースデヒドロゲナーゼ補因子再生系を用いる場合、反応式(1)で表されるようなグルコン酸の共生成($pK_a = 3.6$)は、結果として生ずる水性グルコン酸を別の方法で中和しなければ、その反応混合物のpHを低下させる。反応混合物のpHは、備わっている緩衝能まで緩衝剤がグルコン酸を中和する標準的な緩衝技術によって、またはその変換の過程で並行して塩基を添加することによって、所望のレベルで維持することができる。緩衝と塩基添加とを併用してもよい。所望のpH範囲を維持するために適する緩衝剤は、上に記載されている。グルコン酸の中和に適する塩基は、有機塩基、例えばアミン、アルコキシドなど、および無機塩基、例えば水酸化物塩(例えば、 $NaOH$)、炭酸塩(例えば、 $NaHCO_3$)、重炭酸塩(例えば、 K_2CO_3)、塩基性リン酸塩(例えば、 K_2HPO_4 、 Na_3PO_4)などである。前記変換の過程と並行した塩基の添加は、その反応混合物のpHをモニターしながら手作業で、またはより適便には、pHスタットのような自動滴定装置を使用することによって、行うことができる。プロセス制御のために、部分緩衝能と塩基添加とを併用することもできる。

10

【0247】

ケトレダクターゼ触媒還元反応中に放出されるグルコン酸を中和するために塩基添加を用いる場合、pHを維持するために添加する塩基の量によってその変換の進行をモニターすることができる。代表的に、還元の過程で緩衝されていない反応混合物または部分緩衝反応混合物に添加される塩基は、水溶液で添加される。

【0248】

一部の実施形態において、前記補因子再生系は、ギ酸デヒドロゲナーゼを含み得る。用語「ギ酸デヒドロゲナーゼ」および「FDH」は、二酸化炭素およびNADHまたはNADPHへのホルマー特およびNAD⁺またはNADP⁺の変換をそれぞれ触媒する、NAD⁺またはNADP⁺依存性酵素を指すために、本明細書では交換可能に用いている。本明細書に記載するケトレダクターゼ触媒還元反応における補因子再生系としての使用に適するギ酸デヒドロゲナーゼは、天然由来のギ酸デヒドロゲナーゼと、非天然由来ギ酸デヒドロゲナーゼの両方を含む。ギ酸デヒドロゲナーゼとしては、PCT公報2005/018579の配列番号69および71にそれぞれ対応するポリヌクレオチド配列によってコードされる、PCT公報WO 2005/018579の配列番号70(Pseudomonas種)および72(Candida boidinii)に対応するものが挙げられ、これらの開示は参照により本明細書に援用される。本明細書に記載する方法において用いられるギ酸デヒドロゲナーゼは、天然由来であろうと、または非天然由来であろうと、少なくとも約 $1\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ 、時として少なくとも約 $10\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ 、または少なくとも約 $10^2\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ 、約 $10^3\mu\text{mol}/\text{分}/\text{mg}$ まで、またはそれより高い活性を示すことができ、およびPCT公報WO 2005/018579の実施例4に記載されているアッセイで活性について容易にスクリーニングすることができる。

20

30

【0249】

本明細書において用いる場合、用語「ホルマー特」は、ギ酸アニオン(HCO_2^-)、ギ酸(HCO_2H)、およびこれらの混合物を指す。ホルマー特は、塩の形態、代表的にアルカリまたはアンモニウム塩(例えば、 HCO_2Na 、 $KHCO_2NH_4$ など)の形態で、ギ酸、代表的にギ酸水溶液、の形態で、またはそれらの混合物で供給することができる。ギ酸は、穏やかな酸である。その pK_a (水中で、 $pK_a = 3.7$)の数pH単位以内の水溶液中では、ホルマー特は、平衡濃度で HCO_2^- と HCO_2H の両方として存在する。約pH4より高いpH値では、ホルマー特は、主として HCO_2^- として存在する。ホルマー特をギ酸として供給する場合、代表的に、塩基の添加によってその反応混合物を緩衝してまたはより低酸性にして、代表的に約pH5以上の、所望のpHを生じさせる。ギ酸の中和に適する塩基としては、有機塩基、例えばアミン、アルコキシドなど、および無機塩基、例えば水酸化物塩(例えば、 $NaOH$)、炭酸塩(例えば、 $NaHCO_3$)、重炭酸塩(例えば、 K_2CO_3)、塩基性リン酸塩(例えば、 K_2HPO_4 、 Na_3PO_4)などが挙げられるが、これらに限定されない。

40

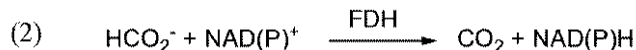
50

【 0 2 5 0 】

ホルマートが主として HCO_2^- として存在する約 pH 5 より高い pH 値については、下の反応式 (2) によって、ホルマートによる NAD^+ または NADP^+ のギ酸デヒドロゲナーゼ触媒還元が説明される。

【 0 2 5 1 】

【 化 1 4 】



ホルマートおよびギ酸デヒドロゲナーゼを補因子再生系として用いる場合、備わっている緩衝能まで緩衝剤がプロトンを放出する標準的な緩衝技術によって、またはその変換の過程と並行して酸を添加することによって、その反応混合物の pH を所望のレベルで維持することができる。pH を維持するためにその反応の過程で添加される適する酸としては、有機酸、例えばカルボン酸、スルホン酸、ホスホン酸など、および鉱酸、例えば、ハロゲン化水素酸 (例えば、塩化水素酸)、硫酸、リン酸など、酸性塩、例えば二水素リン酸塩 (例えば、 KH_2PO_4)、重硫酸塩 (例えば、 NaHSO_4) などが挙げられる。一部の実施形態は、ギ酸を利用し、それによって、その溶液のホルマート濃度と pH の両方を維持する。

【 0 2 5 2 】

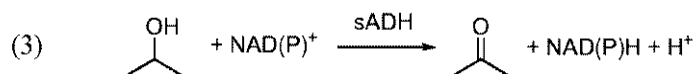
ホルマート / ギ酸デヒドロゲナーゼ補因子再生系を使用する還元反応中に pH を維持するために酸添加を用いる場合、その pH を維持するために添加する酸の量によって、その変換の進行をモニターすることができる。代表的に、変換の過程で緩衝されていない反応混合物または部分緩衝反応混合物に添加される酸は、水溶液で添加される。

【 0 2 5 3 】

用語「第二級アルコールデヒドロゲナーゼ」および「sADH」は、ケトンおよび NADH または NADPH への第二級アルコールおよび NAD^+ または NADP^+ の変換をそれぞれ触媒する、 NAD^+ または NADP^+ 依存性酵素を指すために、本明細書では交換可能に用いている。下の反応式 (3) は、イソプロパノールによって例証される第二級アルコールによる NAD^+ または NADP^+ の還元を説明する。

【 0 2 5 4 】

【 化 1 5 】



本明細書に記載するケトレダクターゼ触媒還元反応において補因子再生系としての使用に適する第二級アルコールデヒドロゲナーゼは、天然由来第二級アルコールデヒドロゲナーゼと、非天然由来第二級アルコールデヒドロゲナーゼの両方を含む。天然由来第二級アルコールデヒドロゲナーゼとしては、*Thermoanaerobium brockii*、*Rhodococcus erythropolis*、*Lactobacillus kefir*、および *Lactobacillus brevis* からの公知アルコールデヒドロゲナーゼが挙げられ、そして非天然由来第二級アルコールデヒドロゲナーゼとしては、それらから誘導された操作されたアルコールデヒドロゲナーゼが挙げられる。本明細書に記載する方法において用いられる第二級アルコールデヒドロゲナーゼは、天然由来であろうと、または非天然由来であろうと、少なくとも約 $1 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 、時として少なくとも約 $10 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 、または少なくとも約 $10^2 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ 、約 $10^3 \mu\text{mol} / \text{分} / \text{mg}$ まで、またはそれより高い活性を示すことができる。

【 0 2 5 5 】

適する第二級アルコールとしては、低級第二級アルコールおよびアリール - アルキルカルピノールが挙げられる。低級第二級アルコールの例としては、イソプロパノール、2 - ブタノール、3 - メチル - 2 - ブタノール、2 - ペンタノール、3 - ペンタノール、3, 3 - ジメチル - 2 - ブタノールなどが挙げられる。1つの実施形態において、前記第二級

10

20

30

40

50

アルコールは、イソプロパノールである。適するアリール - アルキルカルビノールとしては、非置換および置換 1 - アリールエタノールが挙げられる。

【0256】

第二級アルコールおよび第二級アルコールデヒドロゲナーゼを補因子再生系として用いる場合、結果として生ずる NAD^+ または NADP^+ は、その第二級アルコールデヒドロゲナーゼによるその第二級アルコールのケトンへの共役酸化によって還元される。一部の操作されたケトレダクターゼは、第二級アルコール還元体を脱水素する活性も有する。還元体として第二級アルコールを使用する一部の実施形態では、その操作されたケトレダクターゼとその第二級アルコールケトレダクターゼが同じ酵素である。

【0257】

補因子再生系を用いる本明細書に記載するケトレダクターゼ触媒還元反応の実施形態を行う場合、最初にその補因子の酸化形を供給してもよいし、還元形を供給してもよい。上で説明したように、補因子再生系は、酸化された補因子をその還元形に変換し、その後、それがケトレダクターゼ基質の還元を利用される。

【0258】

一部の実施形態では、補因子再生系を使用しない。補因子再生系を使用せずに行われる還元反応については、補因子を還元形で反応混合物に添加する。

【0259】

一部の実施形態において、宿主生物の全細胞を使用して前記プロセスを行う場合、その全細胞は、生得的に補因子を提供することができる。あるいは、または併せて、前記細胞は、生得的にまたは組換えにより、グルコースデヒドロゲナーゼを提供することができる。

【0260】

本明細書に記載する立体選択的還元反応を行う場合、前記操作されたケトレダクターゼ酵素、および任意の補因子再生系を構成する任意の酵素は、精製された酵素の形態、それらの酵素をコードする遺伝子（単数もしくは複数）で形質転換された全細胞の形態、ならびに / またはそのような細胞の細胞抽出物および / もしくは溶解産物の形態で、その反応混合物に添加することができる。操作されたケトレダクターゼ酵素および任意の補因子再生酵素をコードする遺伝子（単数または複数）は、宿主細胞に別々に形質転換することができ、または一緒に同じ宿主細胞に形質転換することができる。例えば、一部の実施形態では、前記操作されたケトレダクターゼ酵素をコードする遺伝子（単数または複数）で 1 セットの宿主細胞を形質転換し、前記補因子再生酵素をコードする遺伝子（単数または複数）で別のセットを形質転換することができる。形質転換された細胞の両方のセットを、一緒に、全細胞の形態で、またはそれから誘導した溶解産物もしくは抽出物の形態で、反応混合物に用いることができる。他の実施形態では、前記操作されたケトレダクターゼ酵素と前記補因子再生酵素の両方をコードする遺伝子（単数または複数）で宿主細胞を形質転換することができる。

【0261】

前記操作されたケトレダクターゼ酵素および / もしくは任意の補因子再生酵素をコードする遺伝子（単数もしくは複数）で形質転換された全細胞、またはそれらの細胞抽出物および / もしくは溶解産物は、固体（例えば、凍結乾燥されたもの、噴霧乾燥されたものなど）または半固体（例えば、粗製ペースト）をはじめとする様々な異なる形態で用いることができる。

【0262】

前記細胞抽出物または細胞溶解産物は、沈殿（硫酸アンモニウム、ポリエチレンジアミンまたは熱処理など）、続いて脱塩手順、その後凍結乾燥（例えば、限外濾過、および透析など）によって部分的に精製することができる。いずれの細胞調製物も、例えばグルタルアルデヒドなどの公知架橋剤を使用する架橋または固相への固定化（例えば、Eupergit C など）によって安定させることができる。

【0263】

固体反応物（例えば、酵素、塩など）は、粉末（例えば、凍結乾燥されたもの、噴霧乾燥されたものなど）、溶液、乳濁液、懸濁液などをはじめとする様々な異なる形態で反応に供給することができる。前記反応物は、当業者に公知である方法および装置を用いて容易に凍結乾燥または噴霧乾燥させることができる。例えば、前記タンパク質溶液を - 8 0 で少量ずつ凍結させ、その後、予冷した凍結乾燥チャンバにそれを添加し、その後、真空を適用することができる。それらのサンプルから水を除去した後、代表的にその温度を 2 時間、4 に上昇させ、その後、真空を解放し、凍結乾燥サンプルを回収する。

【 0 2 6 4 】

一般に、還元反応に使用される反応物の量は、所望される生成物の量によって、および付随して、利用されるケトレダクターゼ基質の量によって変わる。以下のガイドラインを用いて、使用するケトレダクターゼ、補因子および任意の補因子再生系の量を決定することができる。一般に、ケト基質は、約 5 0 m g から約 5 g のケトレダクターゼおよび約 1 0 m g から約 1 5 0 m g の補因子を使用して、約 2 0 から 3 0 0 グラム / リットルの濃度で利用することができる。所望の生産性レベルおよび生産規模に合わせるためにこれらの量を変える方法は、当業者には容易にわかるであろう。任意の補因子再生系の適切な量は、用いる補因子および / またはケトレダクターゼの量に基づき慣用的実験によって容易に決定することができる。一般に、還元体（例えば、グルコース、ホルマート、イソプロパノール）をケトレダクターゼ基質の等モルレベルより高いレベルで用いて、そのケトレダクターゼ基質の本質的に完全なまたはほぼ完全な変換を達成する。

【 0 2 6 5 】

反応物の添加順序は、重要でない。反応物を一緒に溶媒（例えば、単相溶媒、二相水性共溶媒系など）に添加してもよいし、あるいは反応物の一部を別々に、および一部を異なる時点で一緒に添加してもよい。例えば、補因子再生系、補因子、ケトレダクターゼ、およびケトレダクターゼ基質を最初に溶媒に添加してもよい。

【 0 2 6 6 】

水性共溶媒系を使用する際の混合効率改善のために、補因子再生系、ケトレダクターゼ、および補因子を最初に水相に添加して混合する。その後、有機相を添加して混合し、その後、ケトレダクターゼ基質を添加することができる。あるいは、水相に添加する前に、ケトレダクターゼ基質を有機相に予め混合することができる。

【 0 2 6 7 】

本明細書に記載するケトレダクターゼ触媒還元反応を行うために適する条件は、操作されたケトレダクターゼ酵素と基質とを実験 p H および温度で接触させ、例えば本明細書に提供する実施例において説明する方法を用いて、生成物を検出することを含む（しかし、これらに限定されない）慣用的な実験によって、容易に最適化することができる、多種多様な条件を含む。

【 0 2 6 8 】

前記ケトレダクターゼ触媒還元は、代表的に、約 1 5 から約 7 5 の範囲の温度で行われる。一部の実施形態について、前記反応は、約 2 0 から約 5 5 の範囲の温度で行われる。さらに他の実施形態では、約 2 0 から約 4 5 の範囲の温度で行われる。前記反応は、周囲条件下で行われる場合もある。

【 0 2 6 9 】

一般に、前記還元反応を本質的に完了またはほぼ完了するまで進行させ、基質の還元を達成する。基質および / または生成物を検出することによる公知の方法を用いて、基質の生成物への還元をモニターすることができる。適する方法としては、ガスクロマトグラフィー、H P L C などが挙げられる。前記反応混合物において生成されるアルコール還元生成物の変換収率は、一般に約 5 0 % より高く、約 6 0 % より高い場合もあり、約 7 0 % より高い場合もあり、約 8 0 % より高い場合もあり、約 9 0 % より高い場合もあり、および多くの場合、約 9 7 % より高い。

【 実施例 】

【 0 2 7 0 】

本開示の各種の特徴および実施形態は、例証的であり、限定するものではない、次の代表的な実施例で説明する。

【0271】

次の説明において、グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) を使用する場合は必ず、Julich Chiral Solutions, Julich, Germany から入手できる GDH CDX901 である。

【0272】

(実施例1)

野生型ケトレダクターゼ遺伝子獲得および発現ベクターの構築

参照により本明細書に組入れられている米国特許仮出願番号第60/848,950号およびWO2008042876の実施例1に記載された、ケトレダクターゼの報告されたアミノ酸配列およびコドン最適化アルゴリズムに基づいて、E. coli 中での発現のためにケトレダクターゼ (KRED) コード遺伝子を設計した。遺伝子は、42ヌクレオチドで構成されたオリゴヌクレオチドを使用して合成し、lacプロモータの制御下で発現ベクター pCK110900 (米国特許出願公開第20060195947号の図3として示されている) 中にクローニングした。発現ベクターは、P15a複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子も含有していた。得られたプラスミドは標準方法を使用してE. coli W3110に形質転換した。コドン最適化遺伝子およびコード化ポリペプチドも表3に示す。野生型ケトレダクターゼの活性は、米国特許仮出願番号第60/848,950号に記載されているように確認した。

【0273】

10

20

【表 3】

表3:使用したケトレダクターゼの省略形、供給源および参考文献					
ケトレダクターゼの省略形	酵素が最初に同定された微生物	Genbankアクセッション番号	GI番号	ポリヌクレオチド配列番号	ポリヌクレオチド配列番号または供給源
ADH-CM	<i>Candida magnoliae</i>	AB036927.1	12657576	米国特許出願公開第20060195947号において配列番号1	米国特許出願公開第20060195947号において配列番号2
YDL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010159.1	6320079	配列番号109	配列番号110
ADH-LB	<i>Lactobacillus brevis</i>	1NXQ_A	30749782	配列番号1	配列番号2
ADH-RE	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	AAN73270.1	34776951	配列番号111	配列番号112
YGL	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_011476	6321399	配列番号113	配列番号114
YPR	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_010656.1	6320576	配列番号115	配列番号116
GRE	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	NP_014490.1	6324421	配列番号117	配列番号118
ADH-LK	<i>Lactobacillus kefir</i>	AAP94029.1	33112056	配列番号3	配列番号4
ADH-SB	<i>Sporobolomyces salmonicolor</i>	Q9UUN9	30315955	配列番号103	配列番号104
ADH-SC	<i>Streptomyces coelicolor</i>	NP_631415.1	21225636	配列番号101	配列番号102
ADH-TB	<i>Thermoanaerobium brockii</i>	X64841.1	1771790	配列番号107	配列番号108
ADH-HE	ウマ肝臓	DEHOAL	625197	配列番号105	配列番号106
ADH-CP	<i>Candida parapsilosis</i>	BAA24528	2815409		Julich Chiral Solutionsカタログ番号03. 11
DR-LB	<i>Lactobacillus brevis</i> ジアセチルレダクターゼ	ABJ63353.1	116098204		Julich Chiral Solutionsカタログ番号8. 1
ADH-CB	<i>Candida boidinii</i>	CAD66648	28400789		Julich Chiral Solutionsカタログ番号02. 10
LDH-LL	<i>Lactobacillus leichmannii</i>				Flukaカタログ番号61306

本開示の改変ケトレダクターゼをコードするポリヌクレオチドは、E. coli W 3110での発現のためにベクター pCK110900内に同様にクローニングした。

【0274】

(実施例2)

ケトレダクターゼ粉末の生成：振とうフラスコ手順

対象のケトレダクターゼ遺伝子を持つプラスミドを含有するE. coliの単一の菌コ

10

20

30

40

50

ロニーを、 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ クロラムフェニコールおよび 1% グルコースを含有するLB培地 50 mL に接種した。細胞を、 30 のインキュベータにおいて 250 rpm で振とうしながら、一晚（少なくとも 16 時間）増殖させた。培養物を 1 L フラスコ内でTB培地 250 mL （ $12 \text{ g} / \text{L}$ バクトトリプトン、 $24 \text{ g} / \text{L}$ 酵母抽出物、 $4 \text{ mL} / \text{L}$ グリセロール、 65 mM リン酸カリウム、 $\text{pH } 7.0$ 、 1 mM MgSO_4 、 $30 \mu\text{g} / \text{mL}$ クロラムフェニコール）に 600 nm の吸光度（ $\text{OD } 600$ ） 0.2 まで希釈し、 30 で増殖した。培養物の $\text{OD } 600$ が $0.6 \sim 0.8$ であるとき、ケトレダクターゼ遺伝子の発現は 1 mM IPTGによって誘導され、一晚（少なくとも 16 時間）インキュベートされた。細胞を遠心分離（ 5000 rpm 、 15 分、 4 ）によって収集して、上清は廃棄した。細胞ペレットを、等量の 100 mM 冷（ 4 ）トリエタノールアミン（塩化物）緩衝液、 $\text{pH } 7.0$ （ADH-LKおよびADH-LBならびにそれに由来した改変ケトレダクターゼの場合、 2 mM MgSO_4 を含む）で再懸濁し、遠心分離により上記のように収集した。洗浄した細胞を2倍量の冷トリエタノールアミン（塩化物）緩衝液に再懸濁し、 4 に維持しながらフレンチプレスに 12000 psi で2回通した。細胞片を遠心分離（ 9000 rpm 、 45 分、 4 ）によって除去した。透明溶解液上清を収集して、 -20 で貯蔵した。凍結した透明溶解液の凍結乾燥により、粗ケトレダクターゼ酵素の乾燥粉末を得た。

【0275】

（実施例3）

ケトレダクターゼの生成：発酵手順

通気攪拌 15 L 発酵槽で、 $0.88 \text{ g} / \text{L}$ 硫酸アンモニウム、 $0.98 \text{ g} / \text{L}$ クエン酸ナトリウム； $12.5 \text{ g} / \text{L}$ リン酸水素二カリウム三水和物、 $6.25 \text{ g} / \text{L}$ リン酸二水素カリウム、 $6.2 \text{ g} / \text{L}$ T a s t o n e - 154酵母抽出物、 $0.083 \text{ g} / \text{L}$ クエン酸第二鉄アンモニウム、ならびに $2 \text{ g} / \text{L}$ 塩化カルシウム二水和物、 $2.2 \text{ g} / \text{L}$ 硫酸亜鉛七水和物、 $0.5 \text{ g} / \text{L}$ 硫酸マンガニー水和物、 $1 \text{ g} / \text{L}$ 硫酸第一銅七水和物、 $0.1 \text{ g} / \text{L}$ モリブデン酸アンモニウム四水和物および $0.02 \text{ g} / \text{L}$ 四ホウ酸ナトリウム十水和物を含有する $8.3 \text{ mL} / \text{L}$ 微量元素溶液を含有する成長培地 6.0 L の温度を 30 とした。発酵槽に、対象のケトレダクターゼ遺伝子を持つプラスミドを含有し、実施例3に記載するように振とうフラスコ内で $0.5 \sim 2.0$ の開始 $\text{OD } 600$ まで増殖させた、E . c o l i W 3 1 1 0の指数後期培養物を接種した。発酵槽を $500 \sim 1500 \text{ rpm}$ で攪拌し、空気を発酵容器に $1.0 \sim 15.0 \text{ L} / \text{分}$ にて供給して溶解酸素レベルを 30% 飽和またはそれ以上に維持した。 $20\% \text{ v} / \text{v}$ 水酸化アンモニウムの添加により、培養物の pH を 7.0 に制御した。 $500 \text{ g} / \text{L}$ セロース、 $12 \text{ g} / \text{L}$ 塩化アンモニウムおよび $10.4 \text{ g} / \text{L}$ 硫酸マグネシウム七水和物を含有する供給溶液の添加により、培養物の増殖を維持した。培養物は $\text{OD } 600$ が 50 に達した後、イソプロピル - b - D - チオガラクトシド（IPTG）の添加により、ケトレダクターゼの発現を最終濃度 1 mM まで誘導した。培養物をさらに 14 時間増殖させた。次に培養物を 4 まで冷却して、収集するまで 4 に維持した。細胞を、 4 でS o r v a l R C 1 2 B P遠心分離機において 5000 G で 40 分間遠心分離して、収集した。収集した細胞は次の下流回収プロセスで直接使用するか、またはそのように使用するまで 4 にて貯蔵した。

【0276】

細胞ペレットを、湿潤細胞ペーストの各量に対して2倍量の 100 mM トリエタノールアミン（塩化物）緩衝液、 $\text{pH } 6.8$ に 4 で再懸濁した。 12000 psi の圧力を使用して2ステージ・ホモジナイズ・バルブ・アセンブリを装着したホモジナイザに懸濁液を通過させることによって、細胞内ケトレダクターゼを細胞から放出させた。破壊直後に、細胞ホモジネートを 4 まで冷却した。 $10\% \text{ w} / \text{v}$ ポリエチレンイミン溶液、 $\text{pH } 7.2$ を溶解液に最終濃度 $0.5\% \text{ w} / \text{v}$ まで添加して、 30 分間攪拌した。得られた懸濁物を、標準実験用遠心分離機において 5000 G で 30 分間遠心分離にして、清澄にした。透明上清をデカンテーションして、分子量カットオフが 30 Kd のセルロース限外濾過膜を使用して 10 倍に濃縮した。最終濃縮物を浅型コンテナに分配して、 -20 で凍

結し、凍結乾燥し、粉末とした。ケトレダクターゼ粉末は - 80 で貯蔵した。

【0277】

(実施例4)

2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンの (S) - 1 - [2, 6 - ジクロロ - 3 - フルオロフェニル] - エタノールへの変換およびエナンチオマー過剰率を決定する分析方法

2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンの還元およびアルコール生成物のキラル純度は、逆相キラルHPLC (4.6 x 150 mm Chiralpak AD-RHカラム (ガードカートリッジなし); 0.8 mL / 分にて50:50 ACN/H₂O; 25 °C; 次の保持時間による254 nmにおける検出: (S) - アルコール5.77分; (R) - アルコール6.19分; ケトン7.49分) または順相キラルHPLC (4.6 x 250 mm Chiralpak ADカラム (ガードカートリッジなし); 室温で2.5 mL / 分にて2:98 IPA/ヘキサン (調節せず); 次の保持時間による220 nmにおける検出: (S) - アルコール4.72分; (R) - アルコール5.30分; ケトン2.03分) によって決定した。

【0278】

または、次のガスクロマトグラフィー分析方法を使用した: 50 / 分での100 (1分) ~ 200 (4分) の温度プログラムによるHP-5カラム (30 m x 0.25 mm) を使用するアキラル方法 (保持時間は、ケトンで4.33分、アルコールで4.70分であった) および165 等温にてベータシクロデキストリン (DM) カラム (30 m x 0.25 mm) を使用するキラル方法 (保持時間は、ケトンで3.42分、R - 異性体で5.92分、およびS - 異性体で6.25分であった)。

【0279】

(実施例5)

2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンの還元についての野生型ケトレダクターゼの評価

実施例1の表3に記載したKREDを、化学量論的NADHまたはNADPHを補因子として使用してスクリーニングした。96ウェル深型プレートの各ウェルに、KRED 5 ~ 10 mg、100 mM pH 7.0 トリエタノールアミン (塩化物) 緩衝液 500 µL 中のNAD(P)H 20 mg および基質 15 µL を添加した (基質約 40 g / L; 補因子により変換は約 25 に制限)。プレートを密封して、6時間振とうした。EtOAc 1 mL を添加して、反応を停止した。生成物の変換および立体純度を実施例4に記載するようにアッセイした。

【0280】

これらの条件下で、YDL、YGL、GRE、ADH-RE、ADH-SB、ADH-SC、ADH-HL、LDH-LL、ADH-CP、ADH-CB、およびDR-LBは、NADPHまたはNADHのどちらでも検出可能な変換は見られなかったのに対して、ADH-LB、およびYPRでは< 0.5 %の変換が見られた。ADH-LKは、基質の< 1 %をキラルアルコールに変換した。

【0281】

この実施例は、野生型ケトレダクターゼが2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンに対して、有するとしてもごくわずかな活性しか有さないことを示している。

【0282】

(実施例6)

2', 6' - ジクロロ - 3' - フルオロアセトフェノンの還元についてのADH-LK変異体の評価

2007年8月24日に出願された米国特許仮出願番号第60/957,974号および2008年8月24日に出願された米国特許仮出願番号第12/197,286号に記載されているように産生された複数のADH-LK変異体は、実施例5に記載された条件下で評価したとき、表4に挙げるように基質の> 0.5 %をキラルアルコールに変換した

。

【 0 2 8 3 】

【 表 4 】

表4		
配列番号 ^c	変換 ^a	エナンチオマー過剰率 ^b
4	0	0
115	+	+
117	+	++
111	+	++
119	++	++
121	++	++
113	++	++
6	++	++

^a0: 0.5~1%の変換; +: 1~20%の変換; ++>20%の変換^b0: <90%のエナンチオマー過剰率(S-エナンチオマー); +: 90~99%のエナンチオマー過剰率(S-エナンチオマー); ++>99%のエナンチオマー過剰率(S-エナンチオマー)。^c米国特許仮出願番号第60/957, 974号および同第12/197, 286号の配列番号を指す。

本実施例は、190位のチロシン残基がフェニルアラニン、プロリン、システインまたはアラニンに変更されたADH-LK変異体が2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを対応するS-アルコールに還元したことを示す。

【 0 2 8 4 】

(実施例 7)

2', 6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンを還元する酵素を同定するための、高スループットNADPH蛍光プレスクリーン

定方向進化によって得られ、進化したケトレダクターゼ遺伝子を含むプラスミドライブラリをE. coli W3110に形質転換して、1%グルコースおよび30 μg/mLクロラムフェニコール(CAM)を含むルリア-ベルターニ(LB)寒天培地で培養した。30℃にて少なくとも16時間のインキュベーションの後、Q-bot(登録商標)ロボット・コロニー・ピッカー(Geneticix USA, Inc., Beaverton, OR)を使用して、TB培地180 μL、1%グルコースおよび30 μg/mLクロラムフェニコール(CAM)を含む96ウェル浅型ウェル・マイクロタイター・プレートにコロニーをピッキングした。細胞を、200 rpmで振とうしながら30℃にて一晚増殖した。次に、この培養物5 μLを、TB培地380 μL、1 mM MgSO₄および30 μg/mL CAMを含む96ウェル深型ウェルプレートに移した。30℃にて250 rpmで振とうしながらの2.5~3時間にわたる深型ウェルプレートでのインキュベーションの後、イソプロピルチオガラクトシド(IPTG)によって細胞培養物による組み換え遺伝子発現を最終濃度1 mMまで誘導した。次に、プレートを250 rpmで振とうしながら30℃にて15~17時間インキュベートした。

【 0 2 8 5 】

細胞を遠心分離によってペレット化して、溶解緩衝液300 μLに懸濁させ、室温にて少なくとも1時間振とうすることによって溶解させた。溶解緩衝液は、100 mMトリエタノールアミン(塩化物)緩衝液、pH 7.0~7.2、1 mg/mLリゾチームおよび750 μg/mLポリミキシンBサルフェートを含有していた。次にプレートを遠心分離機で400 RPMにて20分間、4℃で回転させ、透明上清(溶解液)を蛍光アッセイで分析した。

【 0 2 8 6 】

96ウェル黒色マイクロタイタープレートで、各溶解液20 μL(40~50℃にて0~24時間前処理; 必要な場合、100 mMトリエタノールアミン(塩化物)緩衝液、pH 7.0、1 mM MgSO₄で希釈)を100 mMトリエタノールアミン(塩化物)緩

10

20

30

40

50

衝液、 $\text{pH} 7.0$ 、 $1 \text{ mM } \text{MgSO}_4$ 、 $0.2 \text{ g/L } \text{NADPH}$ 、 $100 \sim 600 \text{ mM}$ グルコース、 $600 \sim 900 \text{ mM}$ グルコン酸ナトリウムおよび 0.2 g/L $2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロアセトフェノン}$ より成るアッセイ混合物 $180 \mu\text{l}$ に添加して、Flex station (Molecular Devices, USA) で、 330 nm での励起後に 445 nm での NADPH の蛍光の低下を追跡することによって、反応の進行を測定した。

【0287】

本実施例は、 $2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロアセトフェノン}$ の還元率を改良した KRED 変異体を同定するために使用された方法を説明している。

【0288】

(実施例 8)

ADH-LK に由来する改変ケトレダクターゼによる $2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロアセトフェノン}$ の還元

$2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロアセトフェノン}$ の (S) - 1 - [$2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロフェニル}$] - エタノールへの還元のための改良 ADH-LK 変異体を、小規模な化学反応で分析した。PTFE コート磁気攪拌棒および要求に応じて塩基を容器へ供給管を介して pH 制御によって添加するための自動滴定装置に連結された pH 電極を装備した 100 mL 3 口容器に、 25 の 100 mM トリエタノールアミン (塩化物) 緩衝液 ($\text{pH} 7$) 30 mL 、 $2 \text{ mM } \text{MgSO}_4$)、下の表に記載するような配列番号を持つ KRED 200 mg 、GDH 50 mg 、 $\text{NADP} - \text{Na}$ 15 mg 、グルコース 3.1 3 g 、 $2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロアセトフェノン}$ (200 g/L) 6 g を注入した。自動滴定装置は、 $4 \text{ N } \text{NaOH}$ の添加によって pH を 7 に維持し、このことを継続的に記録した。反応の進行は、塩基の率および累積添加量ならびに実施例 4 の方法による酢酸エチルでの抽出および分析のための反応混合物の定期的サンプリングによって監視した。

【0289】

表 5 に、ケトレダクターゼに対応する配列番号、野生型 ADH-LK からのアミノ酸変異の数および $2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロアセトフェノン}$ から (S) - 1 - [$2', 6' - \text{ジクロロ} - 3' - \text{フルオロフェニル}$] - エタノールへの変換を示す。S-アルコールの立体純度は常に $> 99.9\%$ であった。

【0290】

10

20

30

【表 5】

表5:

表5:ADH-LK変異体の活性および安定性			
配列番号	ADH-LKからの変異の数	活性	安定性
4	0	-	
6	1	+	
8	2	++	+
10	2	++	
12	2	+	
14	2	++	
16	2	++	+
48	2	+	
50	2	+	
52	3	+	
20	3	+	+
18	4	+++	+
36	3	+++	
54	3	++	+
56	3	++	
62	3	++	
64	3	++	
58	3	++	
60	2	++	
22	3	++	++
66	3	++	+
68	3	++	++
70	4	++	++
72	3	++	++
32	3	+++	+
28	3	++	+
30	3	++	+
34	4	+++	+
74	4	+++	+
38	4	+++	++
40	5	+++	++
76	5	+++	++
78	5	+++	++
80	5	+++	++
82	5	+++	++
84	8	+++	++
42	6	+++	++
44	6	+++	++
86	7	+++	++
46	6	+++	++
88	6	+++	++
90	6	+++	++
92	6	+++	++
94	6	+++	++

a. -: 活性なし; +: 100~450%の配列番号6の活性; ++: 450~1500%の配列番号6の活性; +++: >1500%の配列番号6の活性。

b. +: 50℃にて2時間後の測定可能な活性; ++: >50℃にて2時間後の配列番号16の400%の活性。

より、ADH-LKと比較して改良された活性が与えられることを示している。

【0291】

(実施例9)

ADH-LBに由来する改変ケトレダクターゼによる2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンの還元

2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンの(S)-1-[2',6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールへの還元のための改良ADH-LB変異体を、実施例8でADH-LK変異体について記載したような小規模な化学反応で分析した。表6に、ケトレダクターゼに対応する配列番号、野生型ADH-LKからのアミノ酸変異の数および2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンから(S)-1-[2',6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールへの変換を示す。S-アルコールの立体純度は常に>99.9%であった。

【0292】

【表6】

表6:

表6:ADH-LK変異体の活性および安定性			
配列番号	ADH-LKからの変異の数	活性	安定性
4	0	-	
6	1	+	
8	2	++	+
10	2	++	
12	2	+	
14	2	++	
16	2	++	+
48	2	+	
50	2	+	
52	3	+	
20	3	+	+
18	4	+++	+

a. -:活性なし;+:100~450%の配列番号6の活性;+:450~1500%の配列番号6の活性;+++:>1500%の配列番号6の活性。

b. +:50℃にて2時間後の測定可能な活性;+:50℃にて2時間後の配列番号16の>40%の活性。

本実施例は、野生型ケトレダクターゼADH-LBに由来する改変ケトレダクターゼによっても、ADH-LBと比較して改良された活性が与えられることを示している。

(実施例10)

(S)-1-[2',6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールの調製規模での生成

Aceガラス機械式スターラ(75mm径テフロン(登録商標)製スターラプレート)と、要求に応じて塩基を送達管を介して容器へpH制御によって添加するための自動滴定装置に連結されたpH電極とを装備した、500mLジャケット付き3口丸底フラスコに、水(120mL)、トリエタノールアミン(1.8g)および次に塩酸を添加してpHを7.0に調整した。硫酸マグネシウムを1M溶液(MgSO₄、120μL、0.12mmol、14.4mg)として添加した。フラスコのジャケット内に加熱流体を循環させて溶液を30℃まで加熱した。グルコース(20g)に続いて、Na-NADP(120mg)、GDH(0.50g)および配列番号38を有するKRED(0.50g)を添加した。送達管を通じての4N NaOHの添加により、pHスタットがpH7.0±0.1を維持するように設定した。2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノ

ン(50g)を添加して反応を開始させた。酵素由来の物質を除去するために、電極を定期的にすすぐ必要があった。反応が進行するにつれて、さらなるグルコースを数回に分けて添加した：104分に10g(4N NaOH 17.5mLを添加した後)、275分に5g(4N NaOH 35.2mLを添加した後)、379分に5g(4N NaOH 42mLを添加した後)、および488分に8g(4N NaOH 47mLを添加した後)。反応は24時間後に停止させた。次にヘプタン(150mL)を添加して、混合物を40℃にて45分間加熱した。30℃に冷却した後、得られた混合物を分液漏斗に注入すると、下部の水層の大半が排出された。上層のヘプタンエマルジョンは真空下、セライトパッドを通して濾過した(350mL、85mm径粗目フィルタ)。フィルタをヘプタン(150mL)で洗浄して、濾液を分液漏斗に移し、2相を分離した。ヘプタン相を回転蒸発器で濃縮して(～50℃、～150mmHg、40mmHgまで上昇)、(S)-1-[2',6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールを油(47.8g、94%)として得たが、これを静置すると結晶化した。

(実施例11)

ADH-LKに由来する改変ケトレダクターゼによる2',6'-置換アセトフェノンの還元

2',6'-ジクロロ-3'-フルオロアセトフェノンの(S)-1-[2',6'-ジクロロ-3'-フルオロフェニル]-エタノールへの還元のために改良された野生型ADH-LKおよびADH-LK変異体を、2つの他の2',6'-置換アセトフェノンに対する活性について試験した。100mMトリエタノールアミン(塩化物)緩衝液5mL(pH7、2mM MgSO₄)、配列番号10を有するKRED33mg、GDH8mg、NADP-Na3mgおよびグルコース330mgの溶液を調整した。この溶液1mLを25%の1mMトリエタノールアミン(塩化物)緩衝液、pH7、0.3mLおよび2',6'-置換アセトフェノン20mgで処理した。反応サンプル(24時間)を実施例5の方法で分析した。

【0293】

表7に、ADH-LKおよび配列番号10を持つADH-LK変異体による、2つの2',6'-置換アセトフェノンの変換および得られたキラルアルコールのエナンチオマー純度を示す。

【0294】

【表7】

表7:

表7:2つの2',6'-置換アセトフェノンに対するADH-LKおよびADH-LK変異体の活性				
2',6'-置換アセトフェノン	野生型ADH-LK (配列番号4)		改変KRED 配列番号10	
	変換(%)	立体純度(%)	変換(%)	立体純度(%)
2',6'-ジクロロアセトフェノン	0	-	88	>99 S
2',6'-ジメトキシアセトフェノン	0	-	72	>99 S

本実施例は、Y190P変異を含有するADH-LK変異体が2',6'-置換アセトフェノンに改良された活性をもたらし、対応する2',6'-置換(S)-1-フェネタノールを与えることを示す。

(実施例12)

ADH-LKおよびY190の変異を含有するADH-LKに由来した改変ケトレダクターゼによる非置換アセトフェノンの還元

実施例7に記載したように調製した、ウェル当り細胞溶解液100μLを含有する96ウェルプレートの各プレートに：100mMトリエタノールアミン(塩化物)緩衝液pH7.0中の7mM Na-NADP⁺50μL、イソプロパノール300μL、およびTHF中の100mg/mLのアセトフェノン50μLを添加した。プレートを密封して、

オービタルシェーカーで850rpm、室温にて24時間攪拌した。メチルト-ブチルエーテル(MTBE)1mLを各ウェルに添加して、プレートを密封し、次に850rpm、室温にて10分間振とうした。プレートを4,000rpm(3220×g)で2分間遠心分離にかけて相を分離し、各ウェルの有機相50μLを、MTBE150μLを含有する浅型ウェルプレートのウェルに移した。プレートを密封して、順相HPLC(OD-Hガードカラムを装備したDaicel Chiralcel OD-Hカラム(4.6×250mm);注入2.5μL;移動相:95:5v/vヘプタン-IPA;流速:1.5mL分-1;カラム温度:40;波長:215nm)によって分析した。保持時間:アセトフェノン:3.5分;(R)-1-フェニルエタノール:5.3分;(S)-1-フェニルエタノール:5.8分。

10

【0295】

表8は、ADH-LKおよびADH-LK変異体によるアセトフェノンの変換および得られたキラルアルコールの立体異性純度を示す。

【0296】

【表8】

表8:

表8:アセトフェノンに対するADH-LK変異体の活性および立体選択性			
配列番号	変換(%)	エナンチオマー過剰率(%)	RまたはS
4(野生型)	94	100	R
14	79	46	S
22	80	35	S
28	80	48	S
32	77	50	S
36	89	86	S
42	90	57	S
44	90	41	S

20

本実施例は、野生型Lactobacillusケトレダクターゼがアセトフェノンに対してR-選択性であり、それに由来する本発明の改変ケトレダクターゼがアセトフェノンに対してS-選択性であることを示す。

30

【0297】

各種の具体的な実施形態が例証および説明されたが、本発明の精神および範囲から逸脱することなく各種の変更を行えることが認識されるであろう。

【0298】

本願で引用されるすべての刊行物、特許、特許出願および他の文書は、各刊行物、特許、特許出願および他の文書それぞれがあらゆる目的のために参照により組入れられるように個別に指示されたのと同じ程度まで、あらゆる目的でその全体が参照により本明細書に組入れられている。

【図 1】

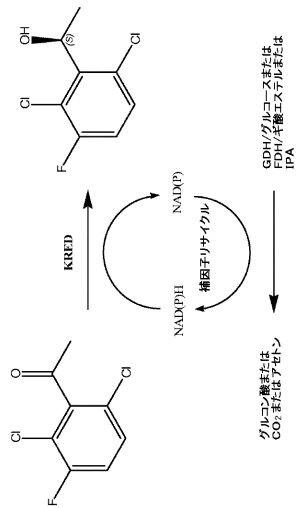


FIG. 1

【配列表】

0005973131000001.app

フロントページの続き

- (72)発明者 ジェニー, ステファン ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, フォスター シティ, カボット レーン
859
- (72)発明者 マンドルフ, エミリー
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, ベルモント, ベルモント キャニオン ロード 2612
- (72)発明者 チン, シャーリーン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95124, サン ノゼ, ケンソン ドライブ 4987
- (72)発明者 グラバー, ジョン エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 95762, エル ドラド ヒルズ, ゲージ コート 111
- (72)発明者 クーレバー, アンケ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94303, パロ アルト, ルイス ロード 3500
- (72)発明者 ヒュイスマン, ジャルト ダブリュー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, ホワード アベニュー 2211

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 山崎 利直

審判官 高堀 栄二

- (56)参考文献 特開平10-28590(JP,A)
SCHLIEBEN, N. H. et al., J. Mol. Biol., (2005), Vol. 349, pp. 801-813
CREASER, E. H. et al., Protein Eng., (1990), Vol. 3, No. 6, pp. 523-526
PHILLIPS, R. S., Can. J. Chem., (2002), Vol. 80, No. 6, pp. 680-685
HAVEEL, J. and WEUSTER-BOTZ, D., Eng. Life Sci., (2006), Vol. 6, No. 2, pp. 175-179

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

IPC C12N15/00-15/90

UniProt/GeneSeq

MEDLINE/CAPLus/BIOSIS/WPIDS(STN)