(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年10月6日(06.10.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/209763 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 15/53 (2006.01) *C12N 15/31* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 15/63* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *C12P 7/02* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 7/24* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) *C12N 15/10* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/010912

(22) 国際出願日： 2022年3月11日(11.03.2022)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-057308 2021年3月30日(30.03.2021) JP

(71) 出願人: 旭化成株式会社 (**ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA**) [JP/JP]; 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目１番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 井阪 光二(**ISAKA Koji**); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目１番２号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP). 宮武 令(**MIYATAKE Ryo**); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目１番２号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP). 片山 沙綾香(**KATAYAMA Sayaka**); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目１番２号 旭化成株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 小野 誠, 外 (**ONO Makoto** et al.); 〒1008136 東京都千代田区大手町一丁目１番１号 大手町パークビルディング アンダーソン・毛利・友常法律事務所 外国法共同事業 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(54) **Title:** RECOMBINANT POLYPEPTIDE HAVING CARBOXYLIC ACID REDUCING ACTIVITY

(54) 発明の名称： カルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチド

(57) **Abstract:** [Problem] To provide a recombinant polypeptide having excellent carboxylic acid reducing activity and a method for producing an aliphatic compound using the recombinant polypeptide. [Solution] A recombinant polypeptide characterized by: (a) comprising amino acid sequence A that has a sequence identity of 60% or higher, 65% or higher, 70% or higher, 75% or higher, 80% or higher, 85% or higher, 88% or higher, 90% or higher, 95% or higher, 97% or higher, 98% or higher or 99% or higher with the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1; (b) said amino acid sequence A having a substitution at at least one amino acid at the position corresponding to the substrate-binding site of a polypeptide that comprises the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 1; and (c) having carboxylic acid reducing activity.

(57) 要約： 【課題】 良好なカルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチド、および、当該組換えポリペプチドを用いた脂肪族化合物の製造方法を提供すること。 【解決手段】 （ａ）配列番号１に示すアミノ酸配列と配列同一性６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、８８％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上のアミノ酸配列Ａからなり、（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも１つが置換されており、（ｃ）カルボン酸還元活性を有する、組換えポリペプチド。

WO 2022/209763 A1

［続葉有］

添付公開書類：

— 国際調査報告（条約第21条(3)）

— 規則13の2に基づいて明細書とは別に提出された、寄託された生物材料に関する表示（規則13の2.4(d)(i)及び48.2(a)(viii)）

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則5.2(a)）

明　細　書

発明の名称 ： カルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチド

技術分野

[0001] 本発明は、カルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチド、および、当該ポリペプチドを用いた脂肪族化合物の製造方法に関する。

背景技術

[0002] 近年の地球温暖化に伴う気象災害や気候変動をうけ、地球環境との共生および環境保全を目指した、サスティナブルなイノベーションの必要性が高まっている。その中でも、再生可能原料を利用することができ、かつ、生体反応を利用した物質生産工程であるバイオプロセスに大きな期待が寄せられている。これまでに、さまざまな化成品の発酵生産プロセスが開発されている。例えば、ポリマー原料として用いられるカルボン酸化合物、例えば、コハク酸およびアジピン酸等の製造について、微生物を用いた発酵生産法が研究されてきた（特許文献１および２）。

[0003] カルボン酸化合物は、ポリマー原料としてだけでなく、アルデヒド、アルコールおよびアミンへと変換しうる原料としても魅力的な化合物である（特許文献３～７、非特許文献１および２）。これらカルボン酸化合物のカルボキシル基を、アルデヒド、アルコールおよびアミン等の置換基へと変換することで、バイオマス由来原料から多様な化合物に展開することができるために、かかる変換技術は必要とされているが、カルボキシル基は熱力学的に安定な状態にあり、化学反応には大きなエネルギーを必要とする。発酵生産にてカルボキシル基を他の置換基へと変換するという観点から、カルボン酸還元能を有する酵素（以下「カルボン酸還元酵素」とも称する。）の探索と応用の試みがなされてきた（特許文献８～１０、非特許文献３）。

[0004] カルボン酸還元酵素の中でも、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｂｓｃｅｓｓｕｓ由来の酵素は、比較的広範な基質に対してカルボキシル基還元活性を示すことから、目的化合物取得のための応用可能性が報告されている（特

許文献１１、非特許文献４および５）。しかしながら、本酵素を含め、カルボン酸還元酵素は全般的に、その反応速度が大きくなく、工業的な利用には十分でない。酵素改変により、触媒活性の向上および酵素の熱安定性の向上の検討がなされているが、依然として、工業用利用に十分な触媒活性は得られていない（非特許文献６）。特に、炭素鎖長の比較的短い基質ほど、酵素活性が下がる傾向にあり、活性の改善が求められている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：米国特許第５５７３９３１号明細書

特許文献2：国際公開第２０１２／１７７７２１号

特許文献3：特表２０１２－５２５８５６号公報

特許文献4：特表２０１６－５３８８７０号公報

特許文献5：特表２０１６－５０１０３１号公報

特許文献6：特表２０１７－５３３７３４号公報

特許文献7：特表２０１６－５３３１６２号公報

特許文献8：特開２０１１－２５４７４７号公報

特許文献9：国際公開第２０１４／０９５９８６号

特許文献10：特表２０１５－５１２６４５号公報

特許文献11：米国特許出願公開第２０２０／００８００６４号明細書

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Ｙｕ，ｅｔ．ａｌ．　Ｄｉｒｅｃｔ　ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　ａｄｉｐｉｃ　ａｃｉｄ　ｆｒｏｍ　ａ　ｓｙｎｔｈｅｔｉｃ　ｐａｔｈｗａｙ　ｉｎ　ｒｅｃｏｍｂｉｎａｎｔ　Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　ｃｏｌｉ，　Ｂｉｏｔｅｃｈｉｎｏｌｏｇｙ　ａｎｄ　Ｂｉｏｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，　Ｗｉｌｅｙ　Ｐｅｒｉｏｄｉｃａｌｓ，　Ｉｎｃ．，　２０１４，　ｖｏｌ．　１１１，　ｐｐ．２５８０．

非特許文献2：Ｙｕ　Ｚｈｏｕ，　ｅｔ．　ａｌ．　Ｂｉｏｓｙｎｔｈｅｓｉｓ　ｏｆ　ａｄｉｐｉｃ　ａｃｉｄ　ｂｙ　ａ　ｈｉｇｈｌｙ　ｅｆｆｉｃ

ient induction－free system in Escherichia Coli, Journal of Biotechnology, Elsevier, 2020, 8, pp. 314－315

非特許文献3：Napora－Wijata et al. Biocatalytic reduction of Carboxylic acid, Biothechnology Journal, Biotechvisions, 2014, 9, pp. 822－843

非特許文献4：Khusnutdinova et al. Exploring Bacterial Carboxylate Reductase for the Reduction of Bifunctional Carboxylic acids, Biothechnology Journal, Wiley－VCH, 2017, 12, 1600751

非特許文献5：Fedrochuk et al. Site－directed mutagenesis and stability of the carboxylic acid reductase MAB4714 from Mycobacterium abscessus, Journal of Biotechnology, Elsevier, 2019, 303, pp. 72－29

非特許文献6：Fedrchuk et. al. One－pot Biocatalytic Transformation of Adipic Acid to 6－aminocaproic Acid and 1, 6－hexamethylenediamine Using Carboxylic Acid Reductases and Transaminases. J. Am. Chem. Soc., 2020, 142, 2, pp. 1038－1048

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明の課題は、カルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチドを提供することにある。また、当該組換えポリペプチドを用いた、脂肪族化合物の製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｂｓｃｅｓｓｕｓ由来の酵素（配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチド）の立体構造の解析から基質結合部位と推定された部位に変異を導入することにより、その酵素活性を向上しうることを見出した。すなわち、本発明は、以下のとおりである：

［１］（ａ）配列番号１に示すアミノ酸配列と配列同一性６０％以上、７０％以上、８０％以上、８５％以上、９０％以上または９５％以上のアミノ酸配列Ａからなり、

（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも１つが置換されており、

（ｃ）カルボン酸還元活性を有する、組換えポリペプチド；

［２］前記（ｂ）における、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記基質結合部位に対応する位置が、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６位に対応する位置である、［１］に記載の組換えポリペプチド；

［３］（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも２つが置換されている、［１］または［２］に記載の組換えポリペプチド；

［４］（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、

・２８３位および３０３位に対応する位置が置換されている、
・２８３位および３３５位に対応する位置が置換されている、
・３０３位および３０６位に対応する位置が置換されている、
・３０３位および３３５位に対応する位置が置換されている、
・３０６位および３３５位に対応する位置が置換されている、または、
・２８３位および３０３位に対応する位置が置換されている、
［１］～［３］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド；
［５］（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、下記（ｉ）～（ｖ）：
（ｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、スレオニンおよびリジンのうちいずれかで置換されている、
（ｉｉ）２８４位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、スレオニンおよびバリンのうちいずれかで置換されている、
（ｉｉｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基が、システインおよびメチオニンのうちいずれかで置換されている、
（ｉｖ）３０６位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニンおよびリジンのうちいずれかで置換されている、
（ｖ）３３５位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、チロシン、フェニルアラニンおよびメチオニンのうちいずれかで置換されている、
の少なくとも１つである、［１］～［４］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド；
［６］（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、下記（ｘｉ）～（ｘｖｉｉｉ）：
（ｘｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３０３位に対応する位置のアミノ酸がメチオニンである、
（ｘｉｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３０３位に対応する位置のアミノ酸がシステインである、
（ｘｉｉｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、

３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｉｖ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がメチオニンであり、３０６位に対応する位置のアミノ酸がリジンである、

（ｘｖ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がメチオニンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｖｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がシステインであり、３０６位に対応する位置のアミノ酸がリジンである、

（ｘｖｉｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がシステインであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｖｉｉｉ）３０６位に対応する位置のアミノ酸残基がリジンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

のいずれかである、［１］～［５］に記載の組換えポリペプチド；

［７］前記（ｃ）のカルボン酸還元活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドのカルボン酸還元活性と比較して向上している、［１］～［６］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド；

［８］Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｎｏｃａｒｄｉａ属、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ属およびＳｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ属からなる群より選択される属の微生物に由来する、［１］～［７］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド；

［９］Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属の微生物に由来する、［１］～［８］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド；

［１０］前記カルボン酸が、

式（Ｉ）：$R^1-(CH_2)_{n1}-COOH$

（式中、R^1は、メチル基、カルボキシル基またはアルデヒド基であり、n^1は、１～１０の整数である）、

または

式（ＩＩ）：$R^2-(CH_2)_{n2}-COOH$

（式中、R^2は、水素、ヒドロキシル基またはアミノ基であり、n^2は、２～

１１の整数である）

で表される、［１］～［９］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド；

［１１］式（Ｉ）において、ｎ[1]が、１～７の整数であり、

式（ＩＩ）において、ｎ[2]が、２～８の整数である、［１０］に記載の組換えポリペプチド；

［１２］式（Ｉ）において、ｎ[1]が、２～４の整数であり、

式（ＩＩ）において、ｎ[2]が、３～５の整数である、［１０］または［１１］に記載の組換えポリペプチド；

［１３］［１］～［１２］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチドをコードするＤＮＡ；

［１４］［１３］に記載のＤＮＡを有する、遺伝子組み換えプラスミド；

［１５］［１４］に記載のＤＮＡが導入された、組換え微生物；

［１６］前記組換え微生物が、炭素数４～１２のジカルボン酸からなる群より選択される少なくとも１つの生産能を有する微生物である、［１５］に記載の組み換え微生物；

［１７］［１５］または［１６］に記載の組換え微生物の培養物および／または培養物の抽出物；

［１８］［１］～［１２］のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド、または、［１７］に記載の培養物および／または培養物の抽出物を、基質化合物と混合して混合液を得ることを含む、目的化合物の製造方法。

［１９］前記基質化合物が、

式（Ｉ）：$R^1-(CH_2)_{n1}-COOH$

（式中、Ｒ[1]は、メチル基、カルボキシル基またはアルデヒド基であり、ｎ[1]は、１～１０の整数である）、

または

式（ＩＩ）：$R^2-(CH_2)_{n2}-COOH$

（式中、Ｒ[2]は水素、ヒドロキシル基またはアミノ基であり、ｎ[2]は、２～１１の整数である）

で表され、

前記目的化合物が、アルデヒドである、［１８］に記載の製造方法。

［２０］前記アルデヒドが、４－アミノブタン－１－アール、５－アミノペンタン－１－アール、６－アミノヘキサン－１－アール、ブタンジアルデヒド、ペンタンジアルデヒド、ヘキサンジアルデヒド、４－ヒドロキシブタン－１－アール、５－ヒドロキシペンタン－１－アール、６－ヒドロキシヘキサン－１－アールおよびグルタルアルデヒドからなる群より選択される、［１９］に記載の製造方法；

［２１］前記目的化合物が、アルコールであり、

前記混合液に、アルデヒドをアルコールに変換する触媒活性を有する酵素を添加し、相当するアルコールを得ることを含む、［１８］に記載の製造方法；

［２２］前記目的化合物が、アミンであり、

前記混合液に、アルデヒドをアミンに変換する触媒活性を有する酵素を添加し、相当するアミンを得ることを含む、［１８］に記載の製造方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、カルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチド、および、当該組換えポリペプチドを用いた脂肪族化合物の製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]野生型カルボン酸還元酵素のアミノ酸配列（配列番号１）を示す図である。

[図2]野生型カルボン酸還元酵素の塩基配列（配列番号２）を示す図である。

[図3]改変型カルボン酸還元酵素１のアミノ酸配列（配列番号３）を示す図である。

[図4]改変型カルボン酸還元酵素２のアミノ酸配列（配列番号４）を示す図である。

[図5A]Ｓｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ　ｒｕｇｏｓｕｓ由来のカルボン酸還元酵

素のアミノ酸配列（配列番号７２）を示す図である。

[図5B]配列番号１のアミノ酸配列と、配列番号１と６１％の配列同一性を有するＳｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ　ｒｕｇｏｓｕｓ由来のカルボン酸還元酵素のアミノ酸配列との、アラインメント結果を示す図である。

[図5C]配列番号１のアミノ酸配列と、配列番号１と６１％の配列類似性を有するＳｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ　ｒｕｇｏｓｕｓ由来のカルボン酸還元酵素のアミノ酸配列との、アラインメント結果の一部を示す図である。

[図6]ｐＳＫ０００のプラスミドの概略図である。

[図7A]各種改変型カルボン酸還元酵素の、基質（アジピン酸）に対する酵素活性（単位時間当たり、単位酵素量あたりの基質消費速度（ｎｍｏｌ／ｍｉｎ／μｇ酵素）として表す）を、野生型カルボン酸還元酵素と比較した図である。図中、「ＷＴ」は野生型酵素を意味する。

[図7B]各種改変型カルボン酸還元酵素の、基質（６－オキソヘキサン酸）に対する酵素活性（単位時間当たり、単位酵素量あたりの基質消費速度（ｎｍｏｌ／ｍｉｎ／μｇ酵素）として表す）を、野生型カルボン酸還元酵素と比較した図である。図中、「ＷＴ」は野生型酵素を意味する。

[図7C]各種改変型カルボン酸還元酵素の、基質（６－アミノカプロン酸）に対する酵素活性（単位時間当たり、単位酵素量あたりの基質消費速度（ｎｍｏｌ／ｍｉｎ／μｇ酵素）として表す）を、野生型カルボン酸還元酵素と比較した図である。図中、「ＷＴ」は野生型酵素を意味する。

[図7D]各種改変型カルボン酸還元酵素の、基質（６－ヒドロキシヘキサン酸）に対する酵素活性（単位時間当たり、単位酵素量あたりの基質消費速度（ｎｍｏｌ／ｍｉｎ／μｇ酵素）として表す）を、野生型カルボン酸還元酵素と比較した図である。図中、「ＷＴ」は野生型酵素を意味する。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を実施するための形態について具体的に説明する。なお、本発明は、以下の実施形態に限定されるものではなく、その要旨の範囲内で種々変形して実施することができる。また、本明細書に記載されているＤＮＡ

の取得、ベクターの調製および形質転換等の遺伝子操作は、特に明記しない限り、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ ４ｔｈ Ｅｄｉｔｉｏｎ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２０１２）、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｇｒｅｅｎｅ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ－Ｉｎｔｅｒｓｃｉｅｎｃｅ）、遺伝子工学実験ノート　（羊土社　田村隆明）等公知の文献に記載されている方法により行なうことができる。なお、本明細書において特に断りのない限りヌクレオチド配列は５’から３’方向に向けて記載される。

[0012]　本発明にかかる組換えポリペプチドは、向上したカルボン酸還元活性を有するように改変が行われたポリペプチドである。本明細書において、ポリペプチドに関し、カルボン酸還元活性とは、カルボン酸のカルボキシル基をアルデヒド基に変換する活性をいう。ここで、「カルボン酸」には、カルボキシル基を１または複数含む化合物が包含される。

[0013]　カルボン酸は、例えば、式：Ｒ－ＣＯＯＨ（式中、Ｒは、Ｃ、Ｈ、Ｏ、Ｎ、Ｓから成る群より選択される１以上の原子から構成される、鎖状または環状の有機基である。）で表される。

[0014]　一態様において、カルボン酸は、

式（Ｉ）：$R^1-(CH_2)_{n1}-COOH$

（式中、R^1は、メチル基、カルボキシル基またはアルデヒド基であり、n^1は、１～１０の整数である）

で表される。式（Ｉ）において、n^1は、好ましくは１～７の整数であり、より好ましくは２～４の整数であり、さらに好ましくは３～４の整数である。

[0015]　別の態様において、カルボン酸は、

式（ＩＩ）：$R^2-(CH_2)_{n2}-COOH$

（式中、R^2は、水素、ヒドロキシル基またはアミノ基であり、n^2は、２～１１の整数である）

で表される。式（ＩＩ）において、n^2は、好ましくは２～８の整数であり、

より好ましくは３～５の整数であり、さらに好ましくは４～５の整数である。

[0016] 本発明にかかる組換えポリペプチドは、下記（ａ）～（ｃ）に示す特性を有する：

（ａ）野生型カルボン酸還元酵素のアミノ酸配列と配列同一性６０％以上のアミノ酸配列Ａからなり、

（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、野生型カルボン酸還元酵素の基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも１つが置換されており、

（ｃ）カルボン酸還元活性を有する。

[0017] 前記（ｃ）のカルボン酸還元活性は、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドのカルボン酸還元活性と比較して向上していることが好ましい。したがって、好ましい態様において、本発明にかかる組換えポリペプチドは、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドのカルボン酸還元活性と比較して向上したカルボン酸還元活性を有する。

[0018] 本発明にかかる組換えポリペプチドは、野生型カルボン酸還元酵素のアミノ酸配列と配列同一性が一定割合以上のアミノ酸配列Ａからなる。野生型カルボン酸還元酵素ポリペプチドは、ＥＣ　１．２．１．３０に分類される。

[0019] 野生型カルボン酸還元酵素は、限定されるものではないが、例えばＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｎｏｃａｒｄｉａ属、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ属およびＳｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ属からなる群より選択される微生物から取得することができる。野生型カルボン酸還元酵素は、好ましくはＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属およびＮｏｃａｒｄｉａ属に属する微生物から、より好ましくはＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属に属する微生物から取得することができ、最も好ましくはＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ　ａｂｓｃｅｓｓｕｓから取得することができる。

[0020] 「野生型カルボン酸還元酵素」は、配列番号１に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドに限定されず、配列番号１に示すアミノ酸配列に、１または複数個のアミノ酸が置換、付加、挿入もしくは欠失されたアミノ酸配列であ

ってもよい。また、当該ポリペプチドのＮ末端およびＣ末端のいずれかまたは両方に、アミノ酸が１または複数個付加されても良い。具体的に、「野生型カルボン酸還元酵素」には、配列番号１に示すアミノ酸配列を有するポリペプチドのほか、配列番号１に示すアミノ酸配列と配列同一性が６０％以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドが包含される。

[0021] 本明細書において、「野生型カルボン酸還元酵素」は、配列番号１に示すアミノ酸配列と配列同一性が６０％以上のアミノ酸配列を有するポリペプチドであり、かつ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（Ｎｉｃｏｔｉｎａｍｉｄｅ ａｄｅｎｉｎｅ ｄｉｎｕｃｌｅｏｔｉｄｅ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ；ＮＡＤＰＨ）およびアデノシン三リン酸（Ａｄｅｎｏｓｉｎｅ ｔｒｉｐｈｏｓｐｈａｔｅ；ＡＴＰ）の存在下、カルボン酸化合物を基質とした還元反応を行うことができるポリペプチドである。したがって、「カルボン酸還元酵素活性」または「カルボン酸還元活性」とは、より具体的には、ＮＡＤＰＨおよびＡＴＰの存在下、カルボン酸化合物を基質とした還元反応を行うことができる活性を意味する。

[0022] 野生型カルボン酸還元酵素の一例として、Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ ａｂｓｃｅｓｓｕｓ由来の野生型カルボン酸還元酵素のアミノ酸配列を配列番号１に示す（図１）。野生型カルボン酸還元酵素の別の例として、Ｓｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ ｒｕｇｏｓｕｓ由来の野生型カルボン酸還元酵素のアミノ酸配列を配列番号７２に示す（図５Ａ）。当該酵素は、配列番号１に示すアミノ酸配列と６１％の配列同一性を有する。

[0023] 本発明にかかる組換えポリペプチドは、野生型カルボン酸還元酵素のアミノ酸配列と配列同一性が一定割合以上のアミノ酸配列Ａからなる。アミノ酸配列Ａは、配列番号１に示すアミノ酸配列との配列同一性が、６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、８８％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上である。

[0024] アミノ酸配列に関し、「配列同一性」は、公知の方法によって決定するこ

とができ、例えば、ＢＬＡＳＴ（Ｂａｓｉｃ　Ｌｏｃａｌ　Ａｌｉｇｎｍｅｎｔ　Ｓｅａｒｃｈ　Ｔｏｏｌ，ｈｔｔｐｓ：／／ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）にて使用することのできるアライメントサーチツールを用いて得られる。このプログラムを使用した配列同一性の決定方法は、上記ウェブサイト、例えば「ヘルプ」セクションを参照することで当業者に理解される。配列の比較には、デフォルトパラメーター（ギャップ存在コスト１１、残基ごとのギャップコスト１）を使用して、ＢＬＡＳＴ（登録商標）（Ｂｌａｓｔｐ）プログラムのＢｌａｓｔ２配列関数が用いられ得る。ポリヌクレオチド配列の「配列同一性」についても同様に、公知の方法によって決定することができる。

[0025] 本発明において使用することのできる野生型カルボン酸還元酵素の遺伝子は、Ｇｅｎｅｂａｎｋ　ｇｅｎｅ　ＩＤ５９６７１７１から配列情報が取得可能であり、例えば配列番号２に示すポリヌクレオチドである（図２）。当該遺伝子は、一般的な遺伝子工学的手法によってＭｙｃｏｂａｃｔｅｒｏｉｄｅｓ　ａｂｓｃｅｓｓｕｓ　ＡＴＣＣ　１９９７７から取得することができる。すなわち、ゲノムＤＮＡを鋳型として、ＰＣＲにより増幅した遺伝子産物として取得し、宿主微生物内での発現に利用することができる。また、有機合成的に調製することによっても取得することができる。また、同一のアミノ酸に最終的に翻訳される代替コドンを利用してよい。典型的には、宿主微生物のコドン使用頻度を考慮した遺伝子配列に置き換える手法である。

[0026] 一態様において、本発明にかかる組換えポリペプチドは、下記（ａ）～（ｃ）に示す特性を有する：

（ａ）配列番号１に示すアミノ酸配列と配列同一性６０％以上のアミノ酸配列Ａからなり、

（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも１つが置換されており、

（ｃ）カルボン酸還元活性を有する。

[0027] 以下では、野生型カルボン酸還元酵素が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドである場合について本発明を詳細に説明する。

[0028] アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも１つが置換されている。好ましくは、アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも２つが置換されている。

[0029] アミノ酸配列Ａに関し、「配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置」とは、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６位に対応する位置である。したがって、アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６位に対応する位置のアミノ酸のうち、１または複数、好ましくは、少なくとも１つ、より好ましくは、少なくとも２つが置換されている。アミノ酸配列Ａが上記置換を有することで、目的基質に対する良好な酵素活性が得られる。好ましくは、アミノ酸配列Ａが上記置換を有することで、目的基質に対する酵素活性が、野生型カルボン酸還元酵素と比較して向上する。基質結合部位の特定方法については後述する。

[0030] アミノ酸配列Ａに関し、「配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、Ｘ位に対応する位置のアミノ酸残基（Ｘは１以上の整数を表す。）」の語には、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、Ｘ位に対応する位置のアミノ酸残基（ケース１）、および

・配列番号１に示すアミノ酸配列のＸ位のアミノ酸残基（ケース２）

の両方が包含されるものとする。

[0031] 具体的に、「配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６

位に対応する位置のアミノ酸残基」の語には、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６位に対応する位置のアミノ酸残基、および

・配列番号１に示すアミノ酸配列の２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６位のアミノ酸残基

の両方が包含される。

[0032] 本明細書において、「対応する位置のアミノ酸残基」は、ＢＬＡＳＴ（ｈｔｔｐｓ：／／ｂｌａｓｔ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／Ｂｌａｓｔ．ｃｇｉ）配列解析ソフトウェアを使用し、基準とするアミノ酸配列（具体的には、配列番号１に示すアミノ酸配列。以下「基準配列」とも称する。）と、対比するアミノ酸配列（具体的には、アミノ酸配列Ａ）とを整列させたとき、基準配列における特定位置と相対する位置のアミノ酸残基のことを指す。例えば、配列番号１に示すアミノ酸配列と、Ｓｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ　ｒｕｇｏｓｕｓ由来のカルボン酸還元酵素のアミノ酸配列（配列番号７２のアミノ酸配列。配列番号１に示すアミノ酸配列と６１％の配列同一性を有する）（図５Ａ）とを、ＢＬＡＳＴ配列解析ソフトウェアを使用して整列させたときのアラインメント結果およびその一部（６１位以降のアミノ酸配列）を図５に示す（図５Ｂおよび図５Ｃ）。図５に示すとおり、Ｓｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ　ｒｕｇｏｓｕｓ由来のカルボン酸還元酵素のアミノ酸において、配列番号１に示すアミノ酸配列の１１５位（配列番号１ではグルタミン残基）に対応する位置のアミノ酸残基は、１１９位のアラニン残基である。

[0033] アミノ酸配列Ａからなる本発明にかかる組換えポリペプチド（「改変型カルボン酸還元酵素」とも称する。）の例を、図３（改変型カルボン酸還元酵素１、配列番号３）および図４（改変型カルボン酸還元酵素２、配列番号４）に示す。図３に示す改変型カルボン酸還元酵素１（配列番号３に示すポリペプチドからなる）は、配列番号１に対して、Ｗ２８３ＲおよびＡ３０３Ｍ

のアミノ酸置換を含む。図４に示す改変型カルボン酸還元酵素２（配列番号４に示すポリペプチドからなる）は、配列番号１に対して、Ｗ２８３ＲおよびＬ３３５Ｆのアミノ酸置換を含む。すなわち、改変型カルボン酸還元酵素１は、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位に対応する位置のアミノ酸残基および３０３位に対応する位置のアミノ酸残基が、それぞれ、アルギニンおよびメチオニンで置換されている。改変型カルボン酸還元酵素２は、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位に対応する位置のアミノ酸残基および３３５位に対応する位置のアミノ酸残基が、それぞれ、アルギニンおよびフェニルアラニンで置換されている。

[0034] 一態様において、本発明にかかる組換えポリペプチドは、アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、下記（ｉ）～（ｖ）：

（ｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、スレオニンおよびリジンのうちいずれかで置換されている、

（ｉｉ）２８４位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、スレオニンおよびバリンのうちいずれかで置換されている、

（ｉｉｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基が、システインおよびメチオニンのうちいずれかで置換されている、

（ｉｖ）３０６位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニンおよびリジンのうちいずれかで置換されている、

（ｖ）３３５位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、チロシン、フェニルアラニンおよびメチオニンのうちいずれかで置換されている、

の少なくとも１つである。

[0035] アミノ酸配列における変異は、上記の置換のうち、１つでもよいし、２以上の組み合わせでもよい。

[0036] 本発明にかかる組換えポリペプチドは、アミノ酸配列Ａにおいて、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位および３０３位に対応する位置が置換されている、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位および３３５位に対応する位置が置換されている、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、３０３位および３０６位に対応する位置が置換されている、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、３０３位および３３５位に対応する位置が置換されている、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、３０６位および３３５位に対応する位置が置換されている、または、

・配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位および３０３位に対応する位置が置換されている。

[0037] 好ましい一態様において本発明にかかる組換えポリペプチドは、２つの変異を含み、アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、下記（ｘｉ）～（ｘｖｉｉｉ）：

（ｘｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３０３位に対応する位置のアミノ酸がメチオニンである、

（ｘｉｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３０３位に対応する位置のアミノ酸がシステインである、

（ｘｉｉｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｉｖ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がメチオニンであり、３０６位に対応する位置のアミノ酸がリジンである、

（ｘｖ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がメチオニンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｖｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がシステインであり、３０６位に対応する位置のアミノ酸がリジンである、

（ｘｖｉｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がシステインであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｖｉｉｉ）３０６位に対応する位置のアミノ酸残基がリジンであり、３

３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

のいずれかである。

[0038] 基質結合部位は、例えば、既存のタンパク質結晶構造情報（プロテインデータバンク，ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｒｃｓｂ．ｏｒｇ／）、および、計算科学的な手法を用いた、酵素－基質結合構造予測によって推定することができる。

[0039] 酵素－基質結合構造予測を行う場合、例えば、ｓｗｉｓｓ－ｍｏｄｅｌソフトウェア（ｈｔｔｐｓ：／／ｓｗｉｓｓｍｏｄｅｌ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／）に代表されるタンパク質三次元構造予測ソフトウェアを用いて、類似アミノ酸配列を持つ酵素の結晶構造に基づいた粗モデルを取得できる。本モデルを分子動力学計算に供することで、動的安定化状態のモデルを取得することができる。

[0040] 前述の方法によって取得されたモデルを、予測された既存の酵素－基質結合構造と重ね合わせることで、基質結合部位を推定することが可能である。タンパク質分子同士の重ね合わせは、たとえば分子グラフィックツールＰｙｍｏｌ（ｈｔｔｐｓ：／／ｐｙｍｏｌ．ｏｒｇ／２／）ソフトウェアを用いて実施することができる。

[0041] 或いは、前述のモデルに目的の基質を当てはめ、分子動力学計算に供し、酵素－基質結合構造の動的安定化モデルを得ることができる。ここで、目的反応における基質の遷移状態構造を、量子化学計算により推定し、酵素－基質結合構造予測に用いることも、より正確な結合モデル推定に有用である。得られた酵素－基質結合構造予測モデルにおいて、基質分子近傍に存在するアミノ酸は、たとえば前述のＰｙｍｏｌソフトウェアを用いて、基質分子周辺の任意の距離内に存在するアミノ酸残基を表示させることで、推定可能である。

[0042] このようにして推定した酵素アミノ酸（群）に、点変異を導入した、網羅的な変異型酵素ライブラリーを作製し、スクリーニングすることで、酵素活性改善に資する基質結合部位を特定することができる。

[0043] 本発明の第２の側面は、上記組換えポリペプチドをコードするＤＮＡである。具体的には、アミノ酸配列ＡをコードするＤＮＡである。組換えポリペプチドをコードするＤＮＡの一例は、上記配列番号２に示すポリヌクレオチドである。

[0044] 本発明の別の側面は、組換えポリペプチドをコードする上記ＤＮＡ（例えば、配列番号２に示すポリヌクレオチド）が導入された組換え微生物である。かかる組換え微生物は、組換えポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を有するＤＮＡをベクターＤＮＡに連結することで組換え体ＤＮＡを作製し、当該組換え体ＤＮＡを用いて宿主微生物の菌株を形質転換することにより取得することができる。

[0045] 宿主微生物は、例えば、ジカルボン酸から選択される少なくとも１つを発現する能力を本来有する微生物である。すなわち、宿主微生物は、例えば、ジカルボン酸から選択される少なくとも１つの生産能を本来有する。ここで、ジカルボン酸は、好ましくは炭素数４～１２のジカルボン酸、より好ましくは炭素数４～６のジカルボン酸である。一態様において、宿主微生物は、より好ましくは、コハク酸、グルタル酸およびアジピン酸からなる群より選択される少なくとも１つを発現する能力を本来有する微生物である。

[0046] 宿主微生物としては、発酵プロセスに使用できる様々な微生物が利用可能であり、例えば細菌、酵母および真菌などから選択される。宿主微生物は、例えば、エシェリキア属、バチルス属、コリネバクテリウム属、クレブシエラ属、クロストリジウム属、グルコノバクター属、ザイモモナス属、ラクトバチルス属、ラクトコッカス属、ストレプトコッカス属、シュードモナス属およびストレプトマイセス属の微生物から選択される。宿主微生物は、遺伝子組み換えが容易であるという観点から、好ましくは大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ　Ｃｏｌｉ）である。

[0047] 本発明にかかる組換えポリペプチドのＤＮＡは、宿主微生物の中で自律複製可能なベクターを用いて宿主微生物に導入されるか、あるいは、本発明にかかる組換えポリペプチドのＤＮＡは、染色体に挿入され複製されてもよい

。ベクターは、例えば、プラスミド、ファージ、トランスポゾン、ＩＳエレメント、ファスミド、コスミド、または線状もしくは環状のＤＮＡ等から成る群から選択される。組換えポリペプチドのＤＮＡは、ベクターに組み入れられ、宿主微生物中に導入される。ベクターは、好ましくは、プラスミドまたはファージである。

[0048] 宿主微生物が大腸菌の場合、好適なプラスミドは、例えば、ｐＬＧ３３８、ｐＡＣＹＣ１８４、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１８、ｐＵＣ１９、ｐＨＳＧ２９８、ｐＨＳＧ３９８、ｐＫＣ３０、ｐＲｅｐ４、ｐＨＳ１、ｐＫＫ２２３－３、ｐＤＨＥ１９．２、ｐＨＳ２、ｐＰＬｃ２３６、ｐＭＢＬ２４、ｐＬＧ２００、ｐＵＲ２９０、ｐＩＮ－ＩＩＩ１１３－Ｂ１、λｇｔ１１およびｐＢｄＣＩである。宿主微生物がバチルス属などの桿菌の場合、好適なプラスミドは、例えば、ｐＵＢ１１０、ｐＣ１９４およびｐＢＤ２１４である。これらの他にも使用可能なプラスミドは、“Ｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ ＤＮＡ ｎａｌｙｓｉｓ ６ｔｈ ｅｄｉｔｉｏｎ”、Ｗｉｌｅｙ－Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ ２０１６に記載されている。

[0049] 本発明に関し、ベクターは、例えば、遺伝子をコードするポリヌクレオチド配列の上流にプロモーター（制御領域）を、また下流にターミネーターをそれぞれ作動可能に連結し、場合によっては、遺伝子マーカー及び／又は他の制御配列を作動可能に連結することにより作製することが可能である。

[0050] 組換え微生物の作製において、組換えポリペプチドの発現強化に適切な発現機構、例えば、プロモーターおよびターミネーターを選択して用いることができる。プロモーターとは、構成発現型プロモーターであるか誘導発現型プロモーターであるかに拘わらず、ＲＮＡポリメラーゼをＤＮＡに結合させ、ＲＮＡ合成を開始させるＤＮＡ配列と定義される。強いプロモーターとはｍＲＮＡ合成を高頻度で開始させるプロモーターであり、本発明においても好適に使用される。大腸菌では、ｌａｃ系、ｔｒｐ系、ｔａｃまたはｔｒｃ系、λファージの主要オペレーター及びプロモーター領域、ｆｄコートタンパク質の制御領域、解糖系酵素（例えば、３－ホスホグリセレートキナーゼ

、グリセルアルデヒド－３－リン酸脱水素酵素）、グルタミン酸デカルボキシラーゼＡ、セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼに対するプロモーター等が利用可能である。ターミネーターとしては、例えば、ｒｒｎＢＴ１Ｔ２ターミネーターおよびｌａｃターミネーターが挙げられる。

[0051] プロモーターおよびターミネーターのほかに用いることのできる、他の調節エレメントは、例えば、選択マーカー、増幅シグナルおよび複製起点などである。調節エレメントは、例えば、“Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ：Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ １８５”、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ （１９９０）に記載されている。

[0052] 本発明で用いる宿主微生物は、当該微生物が本来有するアルコールデヒドロゲナーゼをコードする遺伝子（以下、「アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子」とも称する。）が破壊された微生物であってもよい。このような宿主微生物を用いることで、宿主微生物固有のアルコールデヒドロゲナーゼの混入を避け、目的外の反応の進行を抑制することができる。

[0053] 本発明の別の側面は、先述の組換えポリペプチド、または、当該組換え微生物の培養物および／または培養物の抽出物に関する。

[0054] 本発明にかかる改変型カルボン酸還元酵素を発現した組換え微生物の菌体を用いて、所望の目的化合物を製造することが可能である。例えば、目的化合物がアルコール化合物である場合、アルデヒド還元酵素を添加することができる。目的化合物がアミノ化合物である場合、アミノ基転移酵素を添加するか、もしくは、宿主内でアミノ基転移酵素を共発現させることで、アミノ化合物を製造することが可能である。すなわち、本発明に係る改変型カルボン酸還元酵素をコードするＤＮＡを宿主微生物に導入して得られた組換え微生物を培養し、その培養物を用いて目的化合物を製造する方法も提供される。

[0055] したがって、本発明のさらに別の側面は、先述の組換え微生物を用いた目的化合物の製造方法に関する。具体的には、当該製造方法は、培養物および／または培養物の抽出物を、基質化合物と混合して混合液を得ることを含む

。培養物および／または培養物の抽出物と、基質化合物とを、混合液中で反応させる反応時間は、目的物が生成されうる時間である。反応時間は、例えば、１５分から４８時間である。

[0056] 基質化合物であるカルボンは、例えば、

式（Ｉ）：$R^1-(CH_2)_{n1}-COOH$

（式中、R^1は、メチル基、カルボキシル基またはアルデヒド基であり、n^1は、１～１０の整数である）、

または

式（ＩＩ）：$R^2-(CH_2)_{n2}-COOH$

（式中、R^2は水素、ヒドロキシル基またはアミノ基であり、n^2は、２～１１の整数である）

で表される。

[0057] 上記式（Ｉ）において、n^1は、好ましくは、１～７の整数であり、より好ましくは、２～４の整数である。上記式（ＩＩ）において、n^2は、好ましくは、２～８の整数であり、より好ましくは、３～５の整数である。

[0058] 目的化合物がアルデヒドの場合、アルデヒドは、例えば、４－アミノブタナール、５－アミノペンタナール、６－アミノヘキサナール、ブタンジアルデヒド、ペンタンジアルデヒド、ヘキサンジアルデヒド、４－ヒドロキシブタナール、５－ヒドロキシペンタナール、６－ヒドロキシヘキサナール、４－オキソブタン酸、５－オキソペンタン酸および６－オキソヘキサン酸からなる群より選択される。アルデヒドは、好ましくは、６－アミノヘキサナール、ヘキサンジアルデヒド、６－ヒドロキシヘキサナールおよび６－オキソヘキサン酸からなる群より選択される。

[0059] 別の一態様では、本製造方法において、混合液に、アルデヒドをアルコールに変換する触媒活性を有する酵素を添加し、相当するアルコールを得ることを含む。本態様において、目的化合物はアルコールである。アルコールは、例えば、４－ヒドロキシブタン酸、５－ヒドロキシペンタン酸、６－ヒドロキシヘキサン酸、４－アミノ－１－ブタノール、５－アミノ－１－ペンタ

ノール、６－アミノ－１－ヘキサノール、４－ヒドロキシブタナール、５－ヒドロキシペンタナール、６－ヒドロキシヘキサナール、１，４－ブタンジオール、１，５－ペンタンジオールおよび１，６－ヘキサンジオールからなる群より選択され、好ましくは、６－ヒドロキシヘキサン酸、６－アミノ－１－ヘキサノール、６－ヒドロキシヘキサナールおよび１，６－ヘキサンジオールからなる群より選択される。

[0060] 更に別の一態様では、本製造方法において、混合液に、アルデヒドをアミンに変換する触媒活性を有する酵素を添加し、相当するアミンを得ることを含む。本態様において、目的化合物はアミンである。アミンは、例えば、４－アミノブタン酸、５－アミノペンタン酸、６－アミノヘキサン酸、４－アミノブタナール、５－アミノペンタナール、６－アミノヘキサナール、４－アミノ－１－ブタノール、５－アミノ－１－ペンタノール、６－アミノ－１－ヘキサノール、１，４－ジアミノブタン、１，５－ジアミノペンタンおよび１，６－ジアミノヘキサンからなる群より選択され、好ましくは、６－アミノヘキサン酸、６－アミノヘキサナール、６－アミノ－１－ヘキサノールおよび１，６－ジアミノヘキサンからなる群より選択される。

[0061] 本発明にかかる製造方法は、先述の組み換え微生物を培養し、培養液中に、目的化合物のいずれかを蓄積させ、単離精製することを含んでもよい。

[0062] 本発明にかかるカルボン酸還元酵素の存在下、カルボン酸還元反応を進行させる条件については、目的物が生成される条件であればよく、当業者が通常行う方法で、反応液の組成、ｐＨ、反応温度、反応時間等を調整し、設定することができる。例えば、反応液としては、例えば、ｐＨ７～９の緩衝液が挙げられ、より好ましくは、ｐＨ８～９のＨＥＰＥＳ－ＫＯＨを含む緩衝液が挙げられる。

[0063] カルボン酸還元酵素活性中心においては、ＡＴＰと基質カルボン酸とからアシルＡＭＰが生成したのち、一旦ホスホパンテンテイニル基にアシル基が転位する。カルボン酸還元酵素へホスホパンテテイニル基を供給する目的で、反応液にホスホパンテテイニルトランスフェラーゼを加えることも有効で

ある。本発明に使用するホスホパンテテイニルトランスフェラーゼポリペプチドおよびこれをコードするポリヌクレオチドは、特に限定されるものではないが、Ｎｏｃａｒｄｉａ属から得られるポリヌクレオチド（アクセッションＮｏ．　ＤＱ９０４０３５）とその翻訳産物が利用可能である。反応温度は、通常２０～４０℃であり、より好ましくは３０～３７℃である。反応時間は、目的物が生成されうる時間であればよく、例えば１５分から４８時間である。

[0064] 組換え微生物の培養物および／または培養物の抽出物は、本発明にかかる組換えポリペプチドを含有する酵素含有物、例えば酵素液として調製されてもよい酵素液の調製方法は、本発明にかかる酵素を発現する組換え微生物に対し、例えば、ソニケーション破砕、もしくはビーズミル破砕、もしくはリゾチームを用いて溶菌を行い、その遠心上清を用いることができる。

[0065] 本発明にかかる組換え微生物の培養のための培地組成、培養条件および培養時間は、当業者が通常行う方法により適宜選択できる。培養温度は、典型的には２０～４０℃、好ましくは３０～３７℃の範囲内である。

[0066] 培地は、１つ以上の炭素源、窒素源、無機塩、ビタミン、及び場合により微量元素ないしビタミン等の微量成分を含む、天然、半合成または合成培地であってよい。培地は、培養すべき形質転換体の栄養要求を適切に満たさなければならない。具体的には、宿主微生物が好気性の場合、発酵中の適切な酸素濃度を確保するために振盪を行う必要がある。それらの培養条件は、当業者にとって容易に設定可能である。

[0067] また、培地は、形質転換体が有用な付加的形質を発現する場合、例えば抗生物質への耐性マーカーを有する場合、対応する抗生物質を含んでいてよい。抗生物質を添加することでプラスミドが安定に保持される。抗生物質としては、例えば、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシン、ストレプトマイシンおよびスペクチノマイシンなどが挙げられるが、これらに限定されない。

[0068] 本発明によれば、良好なカルボン酸還元活性を有する組換えポリペプチド

、および、当該組換えポリペプチドを用いた脂肪族化合物の製造方法を提供することができる。具体的には、野生型カルボン酸還元酵素に変異を導入することにより、当該野生型酵素と比較して、より向上した酵素活性を有する改変型酵素を得ることができる。本改変型酵素を用いることにより、目的化合物を効率的に製造できる。また、所望の目的化合物に応じて、追加の酵素を用いて変換を行うことにより、種々の目的化合物を得ることができる。さらに、本発明にかかる改変型酵素は、酵素活性が向上しているため、工業的規模での目的化合物の生産に利用できることが期待される。

[0069] 以上の説明を与えられた当業者は、本発明を十分に実施できる。以下、更なる説明の目的として実施例を記載するが、本発明は当該実施例に限定されるものではない。

実施例

[0070] 以下の実施例に示す全てのＰＣＲは、ＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（タカラバイオ）を用いて実施した。大腸菌の形質転換は、塩化カルシウム法（羊土社　遺伝子工学実験ノート　上　田村隆明著、参照）を用いて行った。プラスミドの構築においては、ＬＢ培地を用い、必要な抗生物質を添加して使用した。本実施例で用いた試薬は、特段記載しない限り、富士フィルム和光純薬社製を使用した。サーマルサイクラーは、すべてＢｉｏ－ｒａｄ社製Ｃ１０００Ｔｏｕｃｈサーマルサイクラーを用いた。

[0071] 各実施例で用いた培地の組成および作製方法は以下のとおりである。

[0072] （ＬＢ培地）

２０ｇ／Ｌ　ＬＢ培地、レノックス（ディフコ社製）に対して、１２０℃、２０分間蒸気滅菌を行った。必要に応じて、終濃度１００ｍｇ／Ｌ　アンピシリン、１．５％　Ｂａｃｔｏ　ａｇａｒ（ディフコ社製）を加えた。

[0073] （ＳＯＣ培地）

まず、２０ｇ／Ｌ　ｂａｃｔｏ　ｔｏｒｙｐｔｏｎｅ（ディフコ社製）、５ｇ／Ｌ　ｂａｃｔｏ　ｙｅａｓｔ　ｅｘｔｒａｃｔ（ディフコ社製）、１

Ｍ　ＮａＣｌ、１Ｍ　ＫＣｌの溶液を１Ｌ作製し、１２０℃、２０分間蒸気滅菌を行って、室温まで冷却した。次に、１Ｍ　$MgSO_4$、１Ｍ　$MgCl_2$、　２Ｍ　Ｇｌｕｃｏｓｅ各１０ｍｌを、フィルトレーションにより殺菌し、前述の混合液へ添加した。

[0074] ＜１＞カルボン酸還元酵素活性中心の推定

改変型酵素を作製するにあたり、以下の方法に従い、活性中心を形成していると考えられるアミノ酸残基を推定した。鋳型とした配列番号１のポリペプチドは、タンパク質結晶構造が報告されていない。そこでまず、ｓｗｉｓｓ－ｍｏｄｅｌ（ｈｔｔｐｓ：／／ｓｗｉｓｓｍｏｄｅｌ．ｅｘｐａｓｙ．ｏｒｇ／、Ｓｗｉｓｓ　Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ　ｏｆ　Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ）ソフトウェアを用いて、配列番号１のポリペプチドの三次元構造の粗モデルを作製した。この時、「５ｍｓｔ」として登録されているＰＤＢエントリーを鋳型とした。この粗モデルをＭＯＥ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｏｐｅｒａｔｉｎｇ　Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ）プラットフォーム（カナダＣＣＧ社製）を用いて水素結合やファンデルワールス力などの分子内相互作用の最適化とＡｍｂｅｒ１０力場とＢｏｒｎ溶媒モデルによる構造最適化を行い、初期モデルを構築した。さらに分子動力学計算を行い、分子全体の安定化モデルを取得した。分子動力学計算は、力場パラメータのパッケージであるＡｍｂｅｒ１４とＧＢ（Ｇｅｎｅｒａｌｉｚｅｄ　Ｂｏｒｎ）溶媒モデルを用いて行った。分子の状態を２ｆｓ（フェムト秒）間隔で５０万回継続する計算により１ｎｓ（ナノ秒）間の分子運動をシミュレーションした。この計算を１ｎｓから２ｎｓおよび３ｎｓへと延長することによって動的に安定な基質－酵素複合体の構造がどのように収束するのかを推定した。ここで酵素内部の基質の動的構造を計算するための力場パラメータが必要なので、半経験的量子力学計算ソフトウェアＭＯＰＡＣを用いて、酵素反応における基質（６－アミノヘキサン酸もしくはヘキサン二酸）の遷移状態構造を予測した。ハミルトニアンＡＭ１　を用いて、反応経路探索と遷移状態最適化を行い、さらに基準振動解析による検定を行った。この遷移状態の構造最適化と

電荷計算をＧａｕｓｓｉａｎに搭載されているＡｎｔｅｃｈａｍｂｅｒを用いてＨａｔｒｅｅ　Ｆｏｃｋ　６／３１Ｇのハミルトニアンを用いて算出した。

[0075] 酵素に結合した基質リガンドとその周辺アミノ酸残基の相互作用は、ＭＯＥを使用して、酵素と遷移状態基質の結合データから構造最適化して評価した。このとき構造最適化アルゴリズムＰｒｏｔｏｎａｔｅ３Ｄを用いて分子内相互作用の最適化を行った。さらにＭＯＥ内のＡｍｂｅｒ９９パラメータで複合体全体の最適化を実施した。また酵素－基質複合体構造より基質周辺５Å以内に位置するアミノ酸残基は、ＶＭＤ（Ｖｉｓｕａｌ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｄｙｎａｍｉｃｓ、イリノイ大学）ソフトウェアにて同定した。

[0076] ＜２＞プラスミドの構築

遺伝子発現用ベクターは次のように作製した。まず、プラスミドｐＮＦＰ－Ａ５１（ＦＥＲＭ　Ｐ－２２１８２として、独立行政法人製品評価技術基盤機構特許生物寄託センター（ＩＰＯＤ）（住所：日本国茨城県つくば市東１丁目１番地１　中央第６）に２０１１年１０月２５日に寄託した。国際寄託番号：ＦＥＲＭ　ＢＰ－１１５１５）のマルチクローニングサイトの、ＢｇｌｌおよびＥｃｏＲＶサイトを利用してプロモーター配列を、Ｘｂａｌ及びＨｉｎｄＩＩＩサイトを使用してターミネーター配列を挿入し、ｐＳＫ０００を構築した。このとき、プロモーター配列末端にＥｃｏＲＶ制限酵素認識配列の上流３塩基対を付加しておくことで、プロモーターおよびターミネーター配列間にＥｃｏＲＶ制限酵素サイトが残存するようにし、後述の酵素遺伝子クローニング時に利用した。プロモーター配列およびターミネーター配列を表１に示す。用いたプライマー配列を表２に示す。ｐＳＫ０００プラスミド構造を図６に示す。用いた制限酵素は、タカラ社製であった。

[0077]

[表1]

	遺伝子配列	配列番号
プロモーター	CTCAAGCCCAAAGGAAGAGTGAGGC GAGTCAGTCGCGTAATGCTTAGGCAC AGGATTGATTTGTCGCAATGATTGAC ACGATTCCGCTTGACGCTGCGTAAGG TTTTTGTAATTTTACAGGCAACCTTT TATTCACTAACAAATAGCTGGTGGAA	5
ターミネーター	AAAAAAAAAAAGGTGCCGTGGAAAC ACGGCACCTTTTTTTTTCTTTA	6

[0078] [表2]

プライマー番号	塩基配列	配列番号
1	ATGACTGAAACGATCTCCACAGCGG	7
2	CTACACCAGGCCCAACAGCTGAATA	8
3	ATGATCGAGACAATTTTGCCTGCTG	9
4	TCAGGCGTACGCGATCGCGG	10
5	ATGATACGCGAGCCTCCGGA	11
6	TTACGCTTCTTCGACACTTACTC	12
7	CTTCTTCTGCCACAAGTTGGCGACC	13
8	TCCGAAGTGCTCTTCGTGCCGC	14
9	ATGGGCAGCAGCCATCACCATC	15
10	GGTATATCTCCTTATTAAAGTTAAAC	16
11	TTTAATAAGGAGATATACCATGATACGCGAGCCTC	17
12	GGTGATGGCTGCTGCCCATTTACGCTTCTTCGACA	18
13	AGCTTGCGGCCGCATAATGCTTAAG	19
14	ATGTATATCTCCTTCTTATACTTAACTAATATAC	20
15	AGAAGGAGATATACATATGACTGAAACGATCTCCA	21
16	GGTGGCAGCAGCCTAGCTACACCAGGCCCAACA	22

[0079] （カルボン酸還元酵素およびホスホパンテンテイニルトランスフェラーゼ発現プラスミドの作製）

カルボン酸還元酵素およびホスホパンテンテイニルトランスフェラーゼをコードするポリヌクレオチドは、ユーロフィンジェノミクス株式会社の人工遺伝子合成サービスを利用して合成した。合成遺伝子配列を鋳型として、各酵素をＰＣＲ増幅した。カルボン酸還元酵素をコードする遺伝子配列は、表２に記載のプライマー１および２を使用し、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（２０ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅの反応条件で増幅さ

せた。ホスホパンテンテイニルトランスフェラーゼをコードする遺伝子配列は、プライマー３及び４を使用し、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（１０ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅの反応条件で増幅させた。

[0080] 次いで、得られたＤＮＡ断片を、Ｍｉｇｈｔｙ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｓｅｔ（Ｔａｋａｒａ社製）にてリン酸化し、クローニングするＤＮＡ断片として用いた。別途、ｐＳＫ０００プラスミドをＥｃｏＲＶ制限酵素で処理し、次いでアルカリフォスファターゼ（ＢＡＰ， タカラ社製）で処理した。前述のＤＮＡ断片とベクター断片を、Ｍｉｇｈｔｙ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｒｅａｇｅｎｔ Ｓｅｔ（Ｔａｋａｒａ社製）を用いてライゲーションした（１６℃、一晩）。ライゲーション反応液１μＬで大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。出現コロニーからプラスミドを抽出して配列解析を行い、酵素タンパク質が発現されるように遺伝子が挿入されたプラスミドを作製した。

[0081]（アミノ基転移酵素発現プラスミドの作製）

アミノ基転移酵素のポリヌクレオチドは、ユーロフィンジェノミクス株式会社の人工遺伝子合成サービスを利用して合成した。遺伝子配列は、ｇｅｎｅｂａｎｋ ｇｅｎｅ ＩＤ７４３５７７０から取得した。合成遺伝子配列を鋳型とし、表２に記載のプライマー５および６を使用し、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（１０ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅの反応条件でＰＣＲを行った。得られたＤＮＡ断片は、前述の手法で、ｐＳＫ０００ベクターのプロモーター下流へライゲーションした（１６℃、一晩）。ライゲーション反応液１μＬで大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。出現コロニーからプラスミドを抽出して配列解析を行い、酵素タンパク質が発現されるように遺伝子が挿入されたプラスミドを取得した。

[0082]（カルボン酸酸化還元酵素の点変異導入酵素発現プラスミドライブラリーの作製）

次に、カルボン酸還元酵素遺伝子配列の、点変異導入網羅的酵素発現ライブラリーの調製を行った。まず、所望のアミノ酸部位に相当する３塩基対を

「ＮＮＫ」とした２００塩基対の遺伝子断片５種を、ユーロフィンジェノミクス株式会社の人工遺伝子断片合成サービスを利用して取得した。配列を表３に示す。

[0083] [表3]

変異導入部位	網羅的点変異導入に用いた合成断片の塩基配列	配列番号
Trp 283	CTTGTGGCAGAAGAAGNNKCTCACCGACGATGTGATTCCGTCC ATAGGCGTGAACTTCATGCCCATGAGCCACCTGGCGGGTCGCC TCACTCTCATGGGCACCCTTTCCGGTGGCGGAACCGCCTACTAC ATCGCTTCGAGCGATCTTTCGACTTTCTTCGAGGACATCGCGCT CATCCGCCCCTCCGAAGTGCTCTTCG	23
Leu 284	CTTGTGGCAGAAGAAGTGGNNKACCGACGATGTGATTCCGTCC ATAGGCGTGAACTTCATGCCCATGAGCCACCTGGCGGGTCGCC TCACTCTCATGGGCACCCTTTCCGGTGGCGGAACCGCCTACTAC ATCGCTTCGAGCGATCTTTCGACTTTCTTCGAGGACATCGCGCT CATCCGCCCCTCCGAAGTGCTCTTCG	24
Ala 303	CTTGTGGCAGAAGAAGTGGCTCACCGACGATGTGATTCCGTCCA TAGGCGTGAACTTCATGCCCATGAGCCACCTGNNKGGTCGCCT CACTCTCATGGGCACCCTTTCCGGTGGCGGAACCGCCTACTACA TCGCTTCGAGCGATCTTTCGACTTTCTTCGAGGACATCGCGCTC ATCCGCCCCTCCGAAGTGCTCTTCG	25
Leu 306	CTTGTGGCAGAAGAAGTGGCTCACCGACGATGTGATTCCGTCCA TAGGCGTGAACTTCATGCCCATGAGCCACCTGGCGGGTCGCNN KACTCTCATGGGCACCCTTTCCGGTGGCGGAACCGCCTACTACA TCGCTTCGAGCGATCTTTCGACTTTCTTCGAGGACATCGCGCTC ATCCGCCCCTCCGAAGTGCTCTTCG	26
Leu 335	CTTGTGGCAGAAGAAGTGGCTCACCGACGATGTGATTCCGTCCA TAGGCGTGAACTTCATGCCCATGAGCCACCTGGCGGGTCGCCT CACTCTCATGGGCACCCTTTCCGGTGGCGGAACCGCCTACTACA TCGCTTCGAGCGATCTTTCGACTTTCTTCGAGGACATCGCGNNK ATCCGCCCCTCCGAAGTGCTCTTCG	27

[0084] 次に、上記カルボン酸還元酵素発現プラスミド１０ｎｇを鋳型として、点変異導入酵素遺伝子断片をクローニングするためのベクター断片を増幅した。表２に記載のプライマー７および８を用い、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（１５ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅの反応条件でＰＣＲを行った。得られたベクター断片は、タカラ社のＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いて、２００塩基対の遺伝子断片と連結し、点変異導入酵素発現プラスミドライブラリーを作製した。

[0085] ＜３＞点変異導入酵素発現プラスミドライブラリーのスクリーニング

改変型カルボン酸還元酵素の一次スクリーニングとして、上記［２］で作成した点変異を導入した網羅的なカルボン酸還元酵素ライブラリーのスクリ

ーニングを行った。まず、点変異導入酵素発現プラスミドライブラリーにより、大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、寒天培地にて３０℃、１日間培養を行った。同様にして、比較のため、野生型酵素発現プラスミドもしくは酵素遺伝子を有しない空プラスミドを用い、大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、寒天培地にて３０℃、１日間培養を行った。出現コロニーをＬＢ培地に植菌し（ディープウェルプレート、１ｍＬ／ウェル）、３０℃にて一晩振とう培養した（Ｍ・ＢＲ－１２１２ＦＰプレートシェーカー、タイテック社製）。培養液各３０μＬをマイクロプレートに移して１０倍希釈し、Ｔｅｃａｎ Ｉｎｆｉｎｉｔｅ ２００ マイクロプレートリーダーでＯＤ６００値を測定し、記録した（ＯＤ６００）。Ｔｈｒｅｍｏ Ｆｉｓｈｅｒ社製Ｓｏｒｖａｌｌ ＳＴ－８ＦＬ遠心機（プレートローター装着）にて、培養後のディープウェルプレートを、２，４５６ ｘｇ、１０分遠心した。上清を捨て、１００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ＝８．０） ５０μＬでペレットを懸濁したのち、リゾチーム溶液１５０μＬを加えた（全２００μＬ、終濃度０．６５ ｍｇ／ｍＬリゾチーム、１ｍＭ ＥＤＴＡ）。タイテック社製Ｄｅｅｐｗｅｌｌ Ｍａｘｉｍｉｚｅｒ 卓上振とう機を用いて、３０℃、４００ｒｐｍで３０分インキュベートし、２５４６ ｘｇ、１０分遠心した。上清５０ｕＬを９６ウェルマイクロプレートに移し、３０℃で予温しておいた基質溶液を添加した（全２５０μＬ， 終濃度０．２ｍＭ ＮＡＤＰＨ、０．５ｍＭ ＡＴＰ、１０ ｍＭ アジピン酸二ナトリウム、１０ｍＭ $MgCl_2$、１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ カリウムバッファー ｐＨ＝８．０）。Ｔｅｃａｎ Ｉｎｆｉｎｉｔｅ ２００ マイクロプレートリーダーを用いて、３４０ｎｍの吸光度を１５分間継時測定した。単位時間当たりの３４０ｎｍ吸光度減少量を算出し、算出した値を、前記ＯＤ６００値で除した。得られた値を野生型酵素と変異型酵素の間で比較したところ、野生型酵素を上回る活性を示す変異体が、複数得られた。３４０ｎｍ吸光度の減少速度が野生型を上回ったウェルの継代コロニーをＬＢ培地にて培養し、プラスミドを抽出して、シークエンス解析を行った。スクリーニングから得られ

た各改変型酵素について、変異点と、野生型カルボン酸還元酵素の活性に対する相対酵素活性を、表４に示す。

[0086] [表4]

表４：各改変型酵素の比活性

		野生型を1としたときの各変異体の比活性							
		変異体に導入されたアミノ酸							
		Lys	Arg	Thr	Val	Met	Phe	Tyr	Cys
酵素中の変異箇所	Trp 283	1.22	1.26	1.05					
	Leu 284		1.08	1.05	1.24				
	Ala 303					1.51			1.36
	Leu 306	1.14	1.12						
	Leu 335		1.27			1.22	1.20	1.25	

[0087] ＜４＞二変異導入カルボン酸還元酵素の構築と各種基質に対する活性評価

（二重変異導入カルボン酸酸化還元酵素発現プラスミドの作製）

前記スクリーニングで得られた、カルボン酸還元酵素活性を向上するアミノ酸変異情報を基に、変異点を２つ組み合わせた変異体発現プラスミドを作成し、酵素活性比較を行った。カルボン酸還元酵素点変異遺伝子配列への、二点目の変異導入は、ＩｎｖｅｒｓｅＰＣＲ法を用いて、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（１０ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅの反応条件で行った。得られたＤＮＡ断片は、Ｍｉｇｈｔｙ　Ｃｌｏｎｉｎｇ　Ｒｅａｇｅｎｔ　Ｓｅｔ（Ｔａｋａｒａ社製）にてリン酸化し、セルフライゲーションした（１６℃、２０分）。ライゲーション反応液１μＬで大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。出現コロニーからプラスミドを抽出して配列解析を行い、目的の変異が導入されたことを確認した。

[0088] （６－オキソヘキサン酸の合成）

６－オキソヘキサン酸は、文献（Ｔｕｒｋ　ｅｔ．ａｌ．　Ｍｅｔａｂｏｌｉｃ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ　ｔｏｗａｒｄ　Ｓｕｓｔａｉｎａｂｌｅ　Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｎｙｌｏｎ－，　ＡＣＳ　Ｓｙｎｔｈｅｔ

ｉｃ Ｂｉｏｌｏｇｙ，ＡＣＳ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎｓ，２０１６，ｖｏｌ．５，ｐｐ ６５－７３．）を参照して合成した。Ｔｏｒｏｎｔｏ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｃｈｅｍ．社製６－オキソヘキサン酸メチル１ｇを、水に添加して１０％ｗ／ｗ％とした。マグネチックスターラーで攪拌しながら、８ＮのＮａＯＨを加え、ｐＨ＝１４に調整した。そのまま常温で２４時間攪拌したのち、５ＮのＨＣｌを加えてｐＨ＝７に中和した。１００μＬずつ１．５ｍＬチューブに分注し、東京理化社製ＣＶＥ－３１１０遠心エバポレーターを使用して２時間濃縮した。－８０℃で３時間凍結後、真空乾燥機で一晩乾燥した。

[0089]（二重変異導入カルボン酸酸化還元酵素の活性評価）

二重変異導入酵素発現プラスミドにより、大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。同様にして、比較のため、野生型酵素発現プラスミドもしくは酵素遺伝子を有しない空プラスミドのうちいずれかを用い、大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換し、寒天培地にて３０℃、１日間培養を行った。出現コロニーをＬＢ培地に植菌し（１５ｍチューブ、液量２ｍＬ）、３０℃にて一晩振とう培養した。残りの培養液を２ｍＬチューブに移し、エッペンドルフ社製Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ５４２４Ｒ卓上微量遠心機にて、８，０００ｒｐｍで３分遠心した。上清を捨て、１００ ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ＝８．０） ２００μＬでペレットを懸濁したのち、超音波破砕機で菌体を破砕した。超音波破砕は、氷上にて、メモリ３の出力で、３０秒発振、３０秒休止、３０秒発振のプロトコルを用いて行った（トミー社製ＵＲ－２１Ｐ）。破砕液を１３，２００ｒｐｍで１５分遠心して、その上清を酵素液として使用した。酵素液を１００ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ＝８．０）で２倍希釈して、５０μＬを９６ウェルマイクロプレートに移し、３０℃で予温しておいた基質溶液を添加した（全２５０μＬ、終濃度０．２ｍＭ ＮＡＤＰＨ、０．５ｍＭ ＡＴＰ、１０ｍＭ $MgCl_2$、１００ｍＭ ＨＥＰＥＳ カリウムバッファー ｐＨ＝８．０）。このとき、基質には、１ｍＭアジピン酸二ナトリウム、１ｍＭ ６－オキソヘキサン酸、１０ｍＭ

６－アミノカプロン酸、０．１ｍＭ　６－ヒドロキシカプロン酸のいずれかを使用した。６－ヒドロキシカプロン酸は、ＡＣＣＵＳＴＡＮＤＡＲＤ社から購入した。Ｔｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　マイクロプレートリーダーを用いて、３４０ｎｍの吸光度を１５分間継時測定した。反応後のアッセイ液５μＬをサンプリングし、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製プロテインアッセイ濃縮色素試薬を用いて、Ｂｒａｄｆｏｒｄ法に基づき全タンパク質濃度を算出した。

[0090] 別途、酵素液５μＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルとして分取し、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製２ｘｌａｅｍｍｕｌｉサンプルバッファー５μＬ（５％　２－メルカプト－１，３－プロパンジオール）と混合した。１００℃で２０分加熱したのち、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製ミニプロティアンＴＧＸゲル（Ａｎｙ　ｋＤ）とミニプロティアンＴｅｔｒａセルＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動槽を使用して、２００Ｖで３０分間泳動した。泳動後のゲルは、Ｂｉｏ－Ｓａｆｅ社製クマシーステイン染色液で３０分染色し、蒸留水で２時間脱色した。脱色したゲルを、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製Ｇｅｌ　ＤｏｃＥＺシステムで撮影し、Ｉｍａｇｅ　ｌａｂソフトウェアを用いて、各レーンの全タンパク質バンド中のカルボン酸還元酵素バンド割合を算出した。全タンパク質濃度にカルボン酸還元酵素バンド割合を乗じて、アッセイ液中のカルボン酸還元酵素濃度とした。さらに３４０ｎｍの吸光度変化から、ＮＡＤＰＨの消費速度を算出し、単位酵素タンパク質あたりのＮＡＤＰＨ消費速度を算出した。値は全て、独立した２培養サンプルの平均値である。評価した二重変異導入カルボン酸還元酵素と、各基質に対する活性を図７Ａ、図７Ｂ、図７Ｃおよび図７Ｄに示す。２８３番目のアミノ酸がアルギニンに、３０３番目のアミノ酸がメチオニンに変異している二重変異体では、どの基質に対しても向上した活性を示した。

[0091] ＜５＞二変異導入カルボン酸還元酵素の酵素学的性質の変化

二重変異体酵素および野生型酵素の酵素学的性質を比較した。野生型酵素発現プラスミド、配列番号３に示す変異型酵素発現プラスミド、酵素遺伝子

を有しない空プラスミドのうちいずれかを用い、大腸菌ＪＭ１０９株を形質転換した。出現コロニーをＬＢ培地に植菌し（１５ｍＬチューブ、液量２ｍＬ）、３０℃にて一晩振とう培養した。培養液各３０μＬを１０倍希釈して、ＯＤ６００値を記録した。残りの培養液を２ｍＬチューブに移し、エッペンドルフ社製Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ５４２４Ｒ卓上微量遠心機にて、８，０００ｒｐｍ　３分遠心した。上清を捨て、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ＝８．０）で、ＯＤ６００＝３０となるようにペレットを懸濁したのち、超音波破砕機で菌体を破砕した。破砕液を１３，２００ｒｐｍで１５分遠心して、その上清を酵素液として使用した。酵素液を１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ＝８．０）で３倍希釈して、５０μＬを９６ウェルマイクロプレートに移し、３０℃で予温しておいた基質溶液を添加した（全２５０μＬ、終濃度０．２ｍＭ　ＮＡＤＰＨ、０．５ｍＭ　ＡＴＰ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳカリウムバッファー　ｐＨ＝８．０）。野生型酵素の実験には、アジピン酸二ナトリウムを、５０ｍＭ、２５ｍＭ、１２．５ｍＭ、６．２５ｍＭおよび３．１２５ｍＭのいずれかの濃度で使用した。変異型酵素の実験には、アジピン酸二ナトリウムを、３ｍＭ、１．５ｍＭ、０．７５ｍＭ、０．３７５ｍＭおよび０．１８７５ｍＭのいずれかの濃度で用いた。Ｔｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００マイクロプレートリーダーを用いて、３４０ｎｍでの吸光度を６０分間継時測定した。反応後のアッセイ液５μＬをサンプリングし、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製プロテインアッセイ濃縮色素試薬を用いて、Ｂｒａｄｆｏｒｄ法に基づき全タンパク質濃度を算出した。

[0092]　別途、酵素液５μＬをＳＤＳ－ＰＡＧＥ用サンプルとして分取し、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製２ｘｌａｅｍｍｕｌｉサンプルバッファー５μＬ（５％　２－メルカプト－１，３－プロパンジオール）と混合した。１００℃で２０分加熱したのち、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製ミニプロティアンＴＧＸゲル（Ａｎｙ　ｋＤ）とミニプロティアンＴｅｔｒａセルＳＤＳ－ＰＡＧＥ電気泳動槽とを使用して、２００Ｖで３０分泳動した。泳動後のゲルは、Ｂｉｏ－Ｓａｆｅ社

製クマシーステイン染色液で３０分染色し、蒸留水で２時間脱色した。脱色したゲルを、Ｂｉｏ－ｒａｄ社製Ｇｅｌ　ＤｏｃＥＺシステムで撮影し、Ｉｍａｇｅ　ｌａｂソフトウェアを用いて、各レーンの全タンパク質バンド中のカルボン酸還元酵素バンド割合を算出した。全タンパク質濃度にカルボン酸還元酵素バンド割合を乗じて、アッセイ液中のカルボン酸還元酵素濃度とした。さらに３４０ｎｍの吸光度変化から、ＮＡＤＰＨの消費速度を算出し、単位酵素タンパク質あたりのＮＡＤＰＨ消費速度を算出した。基質濃度の逆数とＮＡＤＰＨ消費速度の逆数をプロットし、ｘ軸との交点およびｙ軸との交点からそれぞれ、ＫｍおよびＶｍａｘを算出した。各数値を下記表に示す。数値は、独立した２検討の平均値である。アジピン酸に対する変異型酵素のＫｍは、野生型酵素の１／２０以下、既存の変異型カルボン酸還元酵素、すなわちＬ３４２変異型およびＧ４１８Ｅ変異型（Ｆｅｄｒｃｈｕｋ　ｅｔ．ａｌ．　Ｏｎｅ－ｐｏｔ　Ｂｉｏｃａｔａｌｙｔｉｃ　Ｔｒａｎｓｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ａｄｉｐｉｃ　Ａｃｉｄ　ｔｏ　６－ａｍｉｎｏｃａｐｒｏｉｃ　Ａｃｉｄ　ａｎｄ　１，６－ｈｅｘａｍｅｔｈｙｌｅｎｅｄｉａｍｉｎｅ　Ｕｓｉｎｇ　Ｃａｒｂｏｘｙｌｉｃ　Ａｃｉｄ　Ｒｅｄｕｃｔａｓｅｓ　ａｎｄ　Ｔｒａｎｓａｍｉｎａｓｅｓ．　Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．，　２０２０，　１４２，　２，　ｐｐ．１０３８－１０４８（非特許文献６））と比較して、１／１７であり、野生型酵素と比較して改善されていた。

[0093]

[表5]

表５：野生型カルボン酸還元酵素、改変型酵素（配列番号３）および既存改変型酵素の酵素学的性質の比較

	Km (mmol/L)	V_{max} (umol/L/min)	Kcat (sec^{-1})
比較例（野生型、配列番号１）	23.3	18.1	1.68
実施例（W283R/A303M変異型、配列番号３）	1.06	24.8	3.53
比較例（L342E変異型、文献値）	56.6+/-5.0	記載なし	2.72+/-0.09
比較例（G418E変異型、文献値）	18.7+/-2.5	記載なし	4.25+-/0.26

[0094] ＜６＞二変異導入カルボン酸還元酵素を利用した化学品の合成

大腸菌を用いて酵素液を作製するにあたり、大腸菌固有のアルコールデヒドロゲナーゼ混入を避けるため、酵素を発現させる大腸菌株は、アルコールデヒドロゲナーゼＡＤＨ遺伝子破壊株を用いた。以下にＡＤＨ遺伝子破壊プラスミドの作製方法を示す。

[0095] （ＡＤＨ遺伝子破壊プラスミドの作製）

ＡＤＨ遺伝子の破壊は、ｐＨＡＫ１（ＮＩＴＥ　Ｐ－０２９１９として、独立行政法人製品評価技術基盤機構　バイオテクノロジーセンター　特許微生物寄託センター（ＮＰＭＤ）（住所：千葉県木更津市かずさ鎌足２－５－８　１２２号室）に２０１９年３月１８日に寄託した。国際寄託番号：ＮＩＴＥ　ＢＰ－０２９１９）を用いた相同組換え法により行った。ｐＨＡＫ１は温度感受性変異型ｒｅｐＡ遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子、Ｂａｃｉｌｕｓ　ｓｕｂｔｉｌｉｓ由来レバンスクラーゼ遺伝子ＳａｃＢを含む。レバンスクラーゼ遺伝子は、スクロース存在下において宿主微生物に対して致死的に作用する。ＰＣＲ断片の増幅にはＰｒｉｍｅＳＴＡＲ　Ｍａｘ　ＤＮＡ　Ｐｏｌｙｍｅｒａｓｅ（製品名、タカラバイオ製）、プラスミド調製は大腸菌ＨＳＴ０８株を用いて行った。大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）株のゲノムＤＮＡを鋳型とし、破壊標的遺伝子の上流領域、コード領域、および下流領域を含むＰＣＲ産物を得た。標的遺伝子とプライマー配列の組み合わせを表

６に示す。

[0096] [表6]

標的遺伝子	フォワードプライマー			リバースプライマー		
	プライマー番号	塩基配列	配列番号	プライマー番号	塩基配列	配列番号
yqhD	１７	TTGTTGAATAAATCGTCTGTTTGCCGAGAATACGCG	28	１８	TATCGCATGCAGATCTGCGCTAATGGGCTCCAGGA	29
fucO	１９	TTGTTGAATAAATCGCGCGCCAGCGCTGGCTGTTT	30	２０	TATCGCATGCAGATCCCGCCAATGCCGGAAGAGTT	31
adhP	２１	TTGTTGAATAAATCGCGATCGTGATGCCGCTGTCT	32	２２	TATCGCATGCAGATCGACAACGTAGGCTTTGTTCA	33
eutG	２３	TTGTTGAATAAATCGCGCCATCTCGACACTCTTGA	34	２４	TATCGCATGCAGATCGCGAACATCGATGGGTTAGC	35
ybbO	２５	TTGTTGAATAAATCGTGGCATTTGCCCTTCCTGTT	36	２６	TATCGCATGCAGATCGTCCTGATCCTGCAACGGAA	37
ahr	２７	TTGTTGAATAAATCGCTCATAACGGTACTGCAAAC	38	２８	TATCGCATGCAGATCTCGCAGCAGGTAAGATGATT	39
yahK	２９	TTGTTGAATAAATCGATATTCGTCCTAACGAACAG	40	３０	TATCGCATGCAGATCTTTTTGATTTTCAAGTATGT	41

[0097] 次に本ＰＣＲ産物をＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ ＨＤ ｃｌｏｎｉｎｇ ｋｉｔ（製品名、Ｃｌｏｎｔｅｃｈ社製）を用いて、プライマー３１および３２を用いて増幅したｐＨＡＫ１プラスミド断片に挿入し、環状化した。プライマー３１および３２の配列を表７に示す。

[0098] [表7]

プライマー番号	塩基配列	配列番号
３１	GATCTGCATGCGATATCTCTAGAACGCGTAAGCTT	42
３２	TCTCGAGCCGATTTATTCAACAAAGCCGC	43

[0099] 得られた破壊標的遺伝子の上流領域、コード領域、および下流領域のＤＮＡ断片が挿入されたｐＨＡＫ１プラスミドを鋳型として、表８に記載するプライマーを用いてＰＣＲを行い、破壊標的遺伝子のコード領域の一部領域または全領域が除かれたプラスミド断片を得た。

[0100] [表8]

標的遺伝子	フォワードプライマー			リバースプライマー		
	プライマー番号	塩基配列	配列番号	プライマー番号	塩基配列	配列番号
yqhD	33	ACTTTCGTTTTCGGGCATTTCGTCC	44	34	CCAATATGAGGGCAGAGAACGATC	45
fucO	35	ATGCGCTGATGTGATAATGC	46	36	CCTTCTCCTTGTTGCTTTA	47
adhP	37	GAGGCCTTTGCTGCGACTGC	48	38	AGTTCCTCCTTTTCGGATGAT	49
eutG	39	ATGCCGGATGCGACGCTT	50	40	TCATTTTGCATATAGCCCCT	51
ybbO	41	TGACCTGGGCAGTAATGGTG	52	42	CAGGATCTCCGTTGCTTTATGAGTC	53
ahr	43	CGTGGTGTTGAAAGCCGATTATTG	54	44	CATAAACTTCCAGTTCTCCGCCC	55
yahK	45	TCGCACACTAACAGACTGAA	56	46	TGTGTTTACTCCTGATTAGC	57

[0101] 得られたプラスミド断片を末端リン酸化、セルフライゲーションにより環状化し、遺伝子破壊用プラスミドを得た。

[0102] （ＡＤＨ遺伝子破壊大腸菌株の構築）

塩化カルシウム法により、大腸菌ＢＬ２１（ＤＥ３）株に所望の遺伝子の破壊のためのプラスミドを形質転換した後、カナマイシン硫酸塩１００ｍｇ／Ｌを含有するＬＢ寒天培地に塗布し、３０℃で一晩培養して形質転換体を得た。本形質転換体をカナマイシン硫酸塩１００ｍｇ／Ｌを含有するＬＢ培地１ｍＬに一白金耳植菌し、３０℃で振盪培養を行った。得られた培養液を、カナマイシン硫酸塩１００ｍｇ／Ｌを含有するＬＢ寒天培地に塗布し、４２℃で一晩培養した。得られるコロニーはシングルクロスオーバーにより、プラスミドがゲノム中に挿入されている。コロニーをＬＢ液体培地１ｍＬに

一白金耳植菌し、３０℃で振盪培養を行った。得られた培養液を、スクロース１０％を含有するＬＢ寒天培地に塗布し、一晩培養した。得られたコロニーについて、所望の遺伝子が破壊されていることを、表９に示すプライマーセットを用い、コロニーダイレクトＰＣＲにより確認した。以上の操作から、ＡＤＨ７遺伝子が破壊された、ＡＤＨ欠損大腸菌を構築した。

[0103] [表9]

標的遺伝子	フォワードプライマー			リバースプライマー		
	プライマー番号	塩基配列	配列番号	プライマー番号	塩基配列	配列番号
yqhD	47	TATTCTCAATCCGTTTCAGCACGCG	58	48	TTCGGGATCACCACCAGGCCG	59
fucO	49	CGGAAATGGACGAACAGTGG	60	50	CGTCATCAGCGTTTACCAGATT	61
adhP	51	GCATAAACACTGTCCGCGTC	62	52	GAAATCGAGAAGGCAGAAGCGAAA	63
eutG	53	GGTGCGGTCACCATTGTTCG	64	54	CATATCGCACGCCAGCAGTG	65
ybbO	55	GGTGAGGATGGAGAGTTCATG	66	56	CAGTTCGATTTGCGCCACCAG	67
ahr	57	TCCGCTAGTGTGATTTCAGG	68	58	GAAATTATTATGCCGCCAGGCGT	69
yahK	59	TTATGGTCTGGGCGACATGC	70	60	GCATCATCCTGGTCATATACCC	71

[0104] （酵素の調製）

野生型カルボン酸還元酵素発現プラスミド、配列番号３に示す改変型酵素発現プラスミド、アミノ基転移酵素発現プラスミド、酵素遺伝子を有しない空プラスミドのうちいずれかを用い、前記ＡＤＨ欠損大腸菌株を形質転換した。

[0105] コロニーをＬＢ培地に植菌し（１５ｍチューブ、液量２ｍＬ）、３０℃にて一晩振とう培養した。培養液各３０μＬを１０倍希釈して、Ｔｅｃａｎ Ｉｎｆｉｎｉｔｅ ２００ マイクロプレートリーダーでＯＤ６００値を測定し、記録した。残りの培養液を２ｍＬチューブに移し、エッペンドルフ社

製Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ５４２４Ｒ卓上微量遠心機にて、８，０００ｒｐｍで３分遠心した。上清を捨て、１００ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌバッファー（ｐＨ＝８．０）で、ＯＤ６００＝３０となるよう、ペレットを再懸濁したのち、超音波破砕機で菌体を破砕した。破砕液を１３，２００ｒｐｍ　で１５分遠心して、その上清を酵素液として使用した。酵素反応は１．５ｍＬチューブ内で行った。反応液には、カルボン酸還元酵素およびアミノ基転移酵素を含有する酵素液をそれぞれ５０μＬずつ加えた。反応液の組成は次のとおりである。

[0106] 反応条件１；終濃度２ｍＭ　アジピン酸二ナトリウム、５ｍＭ　グルタミン酸ナトリウム、５ｍＭ　ＮＡＤＰＨ，　５ｍＭ　ＡＴＰ，　１０ｍＭ　ＭｇＣｌ２，０．０５ｍＭピリドキサールリン酸、　１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　カリウムバッファー　ｐＨ＝８．０、全量１０００μＬ。

[0107] 反応条件２；終濃度１０ｍＭ　６－アミノカプロン酸、２０ｍＭ　グルタミン酸ナトリウム、２０ｍＭ　ＮＡＤＰＨ、２０ｍＭ　ＡＴＰ、１０ｍＭ　$MgCl_2$、０．０５ｍＭピリドキサールリン酸、１００ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　カリウムバッファー　ｐＨ＝８．０、全量１０００μＬ。

[0108] 調製したチューブを、タイテック社製卓上シェーカー（Ｍ・ＢＲ－０２２ＵＰ）にて、３０℃１０００ｒｐｍで４時間振とうした。反応後のサンプルを、０．５％ギ酸で５倍希釈し、表１０に示す分析方法で分析した。

[0109]

[表10]

カルボン酸、アルコールの分析	
カラム	Shim-Pack SCR(H) +Shim-pack SCR-101H 7.9x300(島津社製)
カラム温度	40℃
溶離液	リン酸水溶液(pH2.3) 0.1wt%
流速	1mL/min
検出器	RI + UV 210nm
注入量	50uL
アミノアルコールの分析	
カラム	Shodex IC YS-G + YS-50 (4.6mm x 125mm) (昭和電工社製)
カラム温度	40℃
溶離液	6mM MSA
流速	1mL/min
検出器	RI
注入量	10uL
アミンの分析	
カラム	Dionex IonPac CG19+CS19 (2mm) (Thermo Fisher社製)
カラム温度	30℃
溶離液	9mM MSA→70mM MSA (10min) →1min保持
流速	0.35mL/min
検出器	Suppressed Conductivity (CSRS 300)
注入量	5uL

[0110] 表１１－１および表１１－２に、基質化合物をカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素とで酵素処理した場合に生成する、ヘキサメチレンジアミンＨＭＤの濃度（μＭ）の分析結果を示す。各値は独立した２アッセイの平均値である。表１１－１および表１１－２において、用いた基質はそれぞれ、アジピン酸（表１１－１）および６－アミノカプロン酸（表１１－２）である。表中、「ＣＡＲ」はカルボン酸還元酵素、「ＡＴ」はアミノ基転移酵素、「ｂｌａｎｋ　ｖｅｃｔｏｒ」は酵素遺伝子配列を持たない空ベクターで形質転換した菌体の破砕物を利用したことを示す。ここで用いた「変異型ＣＡＲ」は、配列番号３に示すアミノ酸配列からなる改変型酵素である。

[0111]

[表11-1]

反応条件１　サンプル	HMD（μM）
AT+野生型CAR（比較例）	8.63
AT+変異型CAR（実施例）	403
ATのみ（比較例）	0.959
野生型CARのみ（比較例）	N.D.
変異型CARのみ（比較例）	N.D.
Blank vector（比較例）	N.D.

[0112] 表１１－１に示される通り、カルボン酸還元酵素もアミノ基転移酵素を添加していないサンプル、およびカルボン酸還元酵素のみのサンプルではアジピン酸からＨＭＤの生成は見られなかった。野生型のカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素を共に添加した場合には、わずかなＨＭＤ生成が認められるが、これと比較して、変異型のカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素を用いた場合には、その５０倍のＨＭＤの生成が認められた。本変異型酵素を用いることで、補酵素の再生系がなくとも、ＨＭＤ生成に寄与できることが分かった。

[0113] [表11-2]

反応条件２　サンプル	HMD（μM）
AT+野生型CAR（比較例）	16.1
AT+変異型CAR（実施例）	81.4
ATのみ（比較例）	4.96
野生型CARのみ（比較例）	N.D.
変異型CARのみ（比較例）	19.7
Blank Vector（比較例）	N.D.

[0114] 表１１－２に示される通り、カルボン酸還元酵素もアミノ基転移酵素も添加していないサンプル、および野生型カルボン酸還元酵素のみのサンプルでは、６－アミノカプロン酸からＨＭＤの生成は見られなかった。野生型のカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素を共に添加した場合には、ＨＭＤ生成

が認められた。興味深いことに、変異型カルボン酸還元酵素のみを添加したサンプルでは、野生型のカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素を共に添加した場合より効率よいＨＭＤの生成が認められた。これは、変異型カルボン酸還元酵素によって、６－アミノカプロン酸がより効率よく還元され、大腸菌内在のアミノ基転移酵素によってさらにＨＭＤへ変換されたものと推定できる。そして変異型のカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素を共に添加したサンプルでは、もっとも高いＨＭＤ濃度が認められた。

[0115] ＜７＞二変異導入カルボン酸還元酵素発現菌を利用した化学品の合成

（カルボン酸還元酵素、アミノ基転酵素共発現用プラスミドの作製）

共発現用プラスミドのバックボーンには、ｐＡＣＹＣＤｕｅｔ（メルク社製）を用いた。まずマルチクローニングサイト１へｙｇｊｇを挿入するため、ｐＡＣＹＣＤｕｅｔを鋳型として、プライマー番号９，１０を使用してＰＣＲを行い、ベクター断片を調製した。次に、アミノ基転移酵素をクローニングしたプラスミドを鋳型として、プライマー番号１１，１２を使用してＰＣＲを行い、ｙｇｊｇ遺伝子断片を得た。得らえた遺伝子断片を、タカラ社のＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いてライゲーションした。次に、マルチクローニングサイト２にカルボン酸還元酵素を挿入するため、先の操作で得られたｙｇｊｇ含有ｐＡＣＹＣプラスミドを鋳型として、プライマー番号１３，１４を使用してＰＣＲを行い、ベクターとなる断片を得た。ＰＣＲ反応条件は、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（３０ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅを用いた。

[0116] 次に、野生型カルボン酸還元酵素または二変異型カルボン酸還元酵素をクローニングしたプラスミドを鋳型として、プライマー番号１５，１６を使用してＰＣＲを行った。ＰＣＲ反応条件は、９８℃（１０ｓｅｃ），５５℃（５ｓｅｃ），７２℃（２０ｓｅｃ），３０ｃｙｃｌｅを用いた。ベクター断片と、野生型もしくは変異型のカルボン酸還元酵素を含むＰＣＲ断片とを、タカラ社のＩｎ－Ｆｕｓｉｏｎ（登録商標） ＨＤ Ｃｌｏｎｉｎｇ Ｋｉｔを用いてライゲーションし、２遺伝子の共発現プラスミドを作製した。

[0117] （培養評価）

酵素を発現させる大腸菌株として、上記＜６＞で作製したＡＤＨ破壊株を用いた。２遺伝子共発現プラスミド、またはｙｇｊｇのみをクローニングしたｐＡＣＹＣ、またはｐＡＣＹＣプラスミドで、前記株を形質転換した。コロニーをＬＢ培地に植菌し（１５ｍチューブ、液量１ｍＬ）、３７℃にて３時間振とう培養した。次に、アジピン酸１０ｍＭを含むＳＯＣ培地へ５％植菌し、３０℃で一晩培養した（１５ｍｌチューブ、液量２ｍｌ）。培養液各３０ｕＬを１０倍希釈して、Ｔｅｃａｎ　Ｉｎｆｉｎｉｔｅ　２００　マイクロプレートリーダーを用いてＯＤ６００値を測定し、記録した。残りの培養液を２ｍＬチューブに移し、エッペンドルフ社製Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ５４２４Ｒ卓上微量遠心機にて、８，０００ｒｐｍ　３分遠心した。上清を０．５％ギ酸で５倍希釈し、前記表１０に示す分析方法で分析した。

[0118] 表１２は、アジピン酸を含有する培地で、野生型または改変型のカルボン酸還元酵素と、アミノ基転移酵素とを発現する菌株を一定時間培養した後、上清に検出されたＨＭＤの濃度（μＭ）を示す。表中、「改変型ＣＡＲ１」は、配列番号３に示すアミノ酸配列からなる組換えポリペプチド（改変型カルボン酸還元酵素１）、「改変型ＣＡＲ２」は、配列番号４に示すアミノ酸配列からなる組換えポリペプチド（改変型カルボン酸還元酵素２）である。各値は独立した２アッセイの平均値である。

[0119] [表12]

導入したカルボン酸還元酵素	HMD（μM）
改変型CAR１（実施例）	116.1
改変型CAR２（実施例）	104.4
野生型（比較例）	72.1
空ベクター（比較例）	N.D.

[0120] 表１２に示される通り、カルボン酸還元酵素およびアミノ基転移酵素を発現していない空ベクターで形質転換した株の培養サンプルでは、アジピン酸からＨＭＤの生成は見られなかった。野生型のカルボン酸還元酵素とアミノ

基転移酵素とを共発現した株の培養サンプルにおいては、ＨＭＤ生成が認められる。これと比較して、変異型のカルボン酸還元酵素とアミノ基転移酵素を用いた場合には、１．４倍から１．６倍のＨＭＤの生成が認められた。変異型カルボン酸還元酵素を用いることで、アジピン酸からＨＭＤへの菌体内変換を促進できることがわかった。

産業上の利用可能性

[0121] 本発明は、カルボン酸還元反応を含む効率的な発酵生産に用いることができ、目的化合物の工業的規模での生産への応用が期待される。

PCT

0-1 0-1-1	様式 PCT/RO/134 この寄託された微生物又はその他の生物材料に関する表示 (PCT規則13の2)は、 右記によって作成された。	 JPO-PAS i450
0-2	国際出願番号	
0-3	出願人又は代理人の書類記号	200888W001

1 1-1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。 段落番号	 0076
1-3 1-3-1 1-3-2 1-3-3 1-3-4	寄託の表示 寄託機関の名称 寄託機関のあて名 寄託の日付 受託番号	 IPOD 独)製品評価技術基盤機構 特許生物寄託センター(NITE-IPOD) 日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 120号室 2011年 10月 25日 (25.10.2011) IPOD BP-11515
1-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国
2 2-1	下記の表示は発明の詳細な説明中に記載された微生物又は生物材料に関連している。 段落番号	 0095
2-3 2-3-1 2-3-2 2-3-3 2-3-4	寄託の表示 寄託機関の名称 寄託機関のあて名 寄託の日付 受託番号	 NPMD (独)製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センター(NPMD) 日本国 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8 122号室 2019年 03月 18日 (18.03.2019) NPMD BP-02919
2-5	この表示を行うための指定国	すべての指定国

受理官庁記入欄

0-4	この用紙は国際出願とともに受理した (はい/いいえ)	レ
0-4-1	権限のある職員	永井 恒男

国際事務局記入欄

0-5	この用紙が国際事務局に受理された日	
0-5-1	権限のある職員	

請求の範囲

[請求項1] （ａ）配列番号１に示すアミノ酸配列と配列同一性６０％以上、６５％以上、７０％以上、７５％以上、８０％以上、８５％以上、８８％以上、９０％以上、９５％以上、９７％以上、９８％以上または９９％以上のアミノ酸配列Ａからなり、

（ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも１つが置換されており、

（ｃ）カルボン酸還元活性を有する、組換えポリペプチド。

[請求項2] 前記（ｂ）における、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの前記基質結合部位に対応する位置が、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、２８３位、２８４位、２９８位、３０３位、３０６位、３３５位、５１２位および９２６位に対応する位置である、請求項１に記載の組換えポリペプチド。

[請求項3] （ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの基質結合部位に対応する位置のアミノ酸のうち少なくとも２つが置換されている、請求項１または２に記載の組換えポリペプチド。

[請求項4] （ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、

・２８３位および３０３位に対応する位置が置換されている、

・２８３位および３３５位に対応する位置が置換されている、

・３０３位および３０６位に対応する位置が置換されている、

・３０３位および３３５位に対応する位置が置換されている、

・３０６位および３３５位に対応する位置が置換されている、または、

・２８３位および３０３位に対応する位置が置換されている、

請求項１～３のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

[請求項5] （ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、下記（ｉ）～（ｖ）：

（ｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、スレオニンおよびリジンのうちいずれかで置換されている、

（ｉｉ）２８４位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、スレオニンおよびバリンのうちいずれかで置換されている、

（ｉｉｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基が、システインおよびメチオニンのうちいずれかで置換されている、

（ｉｖ）３０６位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニンおよびリジンのうちいずれかで置換されている、

（ｖ）３３５位に対応する位置のアミノ酸残基が、アルギニン、チロシン、フェニルアラニンおよびメチオニンのうちいずれかで置換されている、

の少なくとも１つである、請求項１～４のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

[請求項6] （ｂ）前記アミノ酸配列Ａにおいて、配列番号１に示すアミノ酸配列を基準として、下記（ｘｉ）～（ｘｖｉｉｉ）：

（ｘｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３０３位に対応する位置のアミノ酸がメチオニンである、

（ｘｉｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３０３位に対応する位置のアミノ酸がシステインである、

（ｘｉｉｉ）２８３位に対応する位置のアミノ酸残基がアルギニンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｉｖ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がメチオニンであり、３０６位に対応する位置のアミノ酸がリジンである、

（ｘｖ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がメチオニンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｖｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がシステインであり、３０６位に対応する位置のアミノ酸がリジンである、

（ｘｖｉｉ）３０３位に対応する位置のアミノ酸残基がシステインであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

（ｘｖｉｉｉ）３０６位に対応する位置のアミノ酸残基がリジンであり、３３５位に対応する位置のアミノ酸がフェニルアラニンである、

のいずれかである、請求項１～５に記載の組換えポリペプチド。

[請求項7] 前記（ｃ）のカルボン酸還元活性が、配列番号１に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドのカルボン酸還元活性と比較して向上している、請求項１～６のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

[請求項8] Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属、Ｎｏｃａｒｄｉａ属、Ｎｅｕｒｏｓｐｏｒａ属およびＳｅｇｎｉｌｉｐａｒｕｓ属からなる群より選択される属の微生物に由来する、請求項１～７のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

[請求項9] Ｍｙｃｏｂａｃｔｅｒｉｕｍ属の微生物に由来する、請求項１～８のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

[請求項10] 前記カルボン酸が、

式（Ｉ）：$R^1-(CH_2)_{n1}-COOH$

（式中、R^1は、メチル基、カルボキシル基またはアルデヒド基であり、n^1は、１～１０の整数である）、

または

式（ＩＩ）：$R^2-(CH_2)_{n2}-COOH$

（式中、R^2は、水素、ヒドロキシル基またはアミノ基であり、n^2は、２～１１の整数である）

で表される、請求項１～９のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド。

[請求項11] 式（Ｉ）において、n^1が、１～７の整数であり、

式（ＩＩ）において、ｎ^{2}が、２～８の整数である、請求項１０に記載の組換えポリペプチド。

[請求項12] 式（Ｉ）において、ｎ^{1}が、２～４の整数であり、

式（ＩＩ）において、ｎ^{2}が、３～５の整数である、請求項１０または１１に記載の組換えポリペプチド。

[請求項13] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の組換えポリペプチドをコードするＤＮＡ。

[請求項14] 請求項１３に記載のＤＮＡを有する、遺伝子組み換えプラスミド。

[請求項15] 請求項１４に記載のＤＮＡが導入された、組換え微生物。

[請求項16] 前記組換え微生物が、炭素数４～１２のジカルボン酸からなる群より選択される少なくとも１つの生産能を有する微生物である、請求項１４に記載の組み換え微生物。

[請求項17] 請求項１５または１６に記載の組換え微生物の培養物および／または培養物の抽出物。

[請求項18] 請求項１～１２のいずれか１項に記載の組換えポリペプチド、または、請求項１７に記載の培養物および／または培養物の抽出物を、基質化合物と混合して混合液を得ることを含む、目的化合物の製造方法。

[請求項19] 前記基質化合物が、

式（Ｉ）：$R^{1}-(CH_{2})_{n1}-COOH$

（式中、Ｒ^{1}は、メチル基、カルボキシル基またはアルデヒド基であり、ｎ^{1}は、１～１０の整数である）、

または

式（ＩＩ）：$R^{2}-(CH_{2})_{n2}-COOH$

（式中、Ｒ^{2}は水素、ヒドロキシル基またはアミノ基であり、ｎ^{2}は、２～１１の整数である）

で表され、

前記目的化合物が、アルデヒドである、請求項１８に記載の製造方

法。

[請求項20] 前記アルデヒドが、４－アミノブタン－１－アール、５－アミノペンタン－１－アール、６－アミノヘキサン－１－アール、ブタンジアルデヒド、ペンタンジアルデヒド、ヘキサンジアルデヒド、４－ヒドロキシブタン－１－アール、５－ヒドロキシペンタン－１－アール、６－ヒドロキシヘキサン－１－アールおよびグルタルアルデヒドからなる群より選択される、請求項１９に記載の製造方法。

[請求項21] 前記目的化合物が、アルコールであり、

前記混合液に、アルデヒドをアルコールに変換する触媒活性を有する酵素を添加し、相当するアルコールを得ることを含む、請求項１８に記載の製造方法。

[請求項22] 前記目的化合物が、アミンであり、

前記混合液に、アルデヒドをアミンに変換する触媒活性を有する酵素を添加し、相当するアミンを得ることを含む、請求項１８に記載の製造方法。

[図1]

（配列番号１）

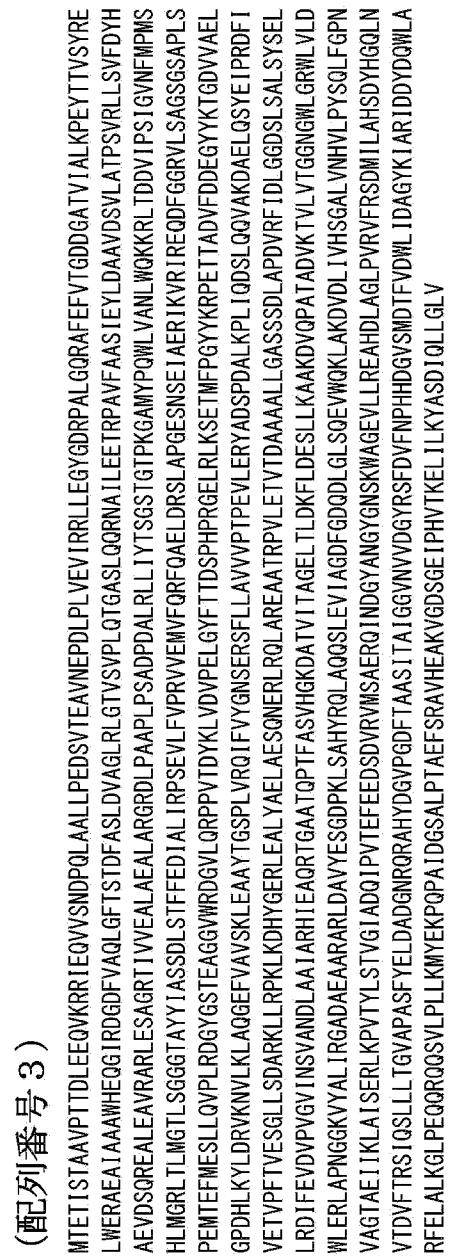
MTETISTAAVPTTDLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPED
SVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYGDRPALGQRAFEFVTG
DDGATVIALKPEYTTVSYRELWERAEAIAAAWHEQGIRDG
DFVAQLGFTSTDFASLDVAGLRLGTVSVPLQTGASLQQRN
AILEETRPAVFAASIEYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYH
AEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALARGRDLP
AAPLPSADPDALRLLIYTSGSTGTPKGAMYPQWLVANLWQ
KKWLTDDVIPSIGVNFMPMSHLAGRLTLMGTLSGGGTAYY
IASSDLSTFFEDIALIRPSEVLFVPRVVEMVFQRFQAELD
RSLAPGESNSEIAERIKVRIREQDFGGRVLSAGSGSAPLS
PEMTEFMESLLQVPLRDGYGSTEAGGVWRDGVLQRPPVTD
YKLVDVPELGYFTTDSPHPRGELRLKSETMFPGYYKRPET
TADVFDDEGYYKTGDVVAELGPDHLKYLDRVKNVLKLAQG
EFVAVSKLEAAYTGSPLVRQIFVYGNSERSFLLAVVVPTP
EVLERYADSPDALKPLIQDSLQQVAKDAELQSYEIPRDFI
VETVPFTVESGLLSDARKLLRPKLKDHYGERLEALYAELA
ESQNERLRQLAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSSDLAP
DVRFIDLGGDSLSALSYSELLRDIFEVDVPVGVINSVAND
LAAIARHIEAQRTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLD
KFLDESLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVLD
WLERLAPNGGKVYALIRGADAEAARARLDAVYESGDPKLS
AHYRQLAQQSLEVIAGDFGDQDLGLSQEVWQKLAKDVDLI
VHSGALVNHVLPYSQLFGPNVAGTAEIIKLAISERLKPVT
YLSTVGIADQIPVTEFEEDSDVRVMSAERQINDGYANGYG
NSKWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMILAHSDYHGQLN
VTDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVP
GDFTAASITAIGGVNVVDGYRSFDVFNPHHDGVSMDTFVD
WLIDAGYKIARIDDYDQWLARFELALKGLPEQQRQQSVLP
LLKMYEKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAKVGDSGEIPHV
TKELILKYASDIQLLGLV

[図2]

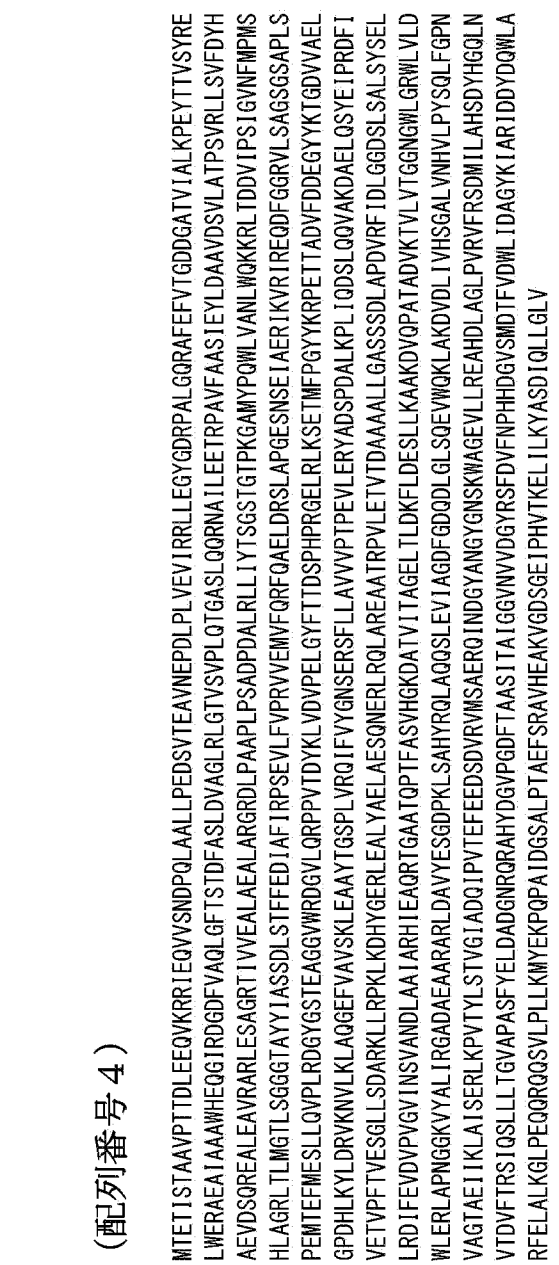
（配列番号２）

ATGACTGAAACGATCTCCACAGCGGCTGTCCCCACTACGGATCTCGAAGAGCAGGTGAAGCGACGCATCGAGCAGGTCGTGTCCAA
CGATCCGCAGCTGGCGGCGCTTCTCCCGGAAGATTCGGTCACCGAGGCGGTCAACGAGCCCGATCTACCGCTGGTCGAGGTGATCA
GGCGACTGCTGGAGGGCTACGGTGACCGCCCGGCACTCGGCCAGCGCGCCTTCGAGTTCGTCACCGGGGACGACGGTGCGACCGTG
ATCGCGCTGAAGCCCGAATACACCACCGTCTCCTACCGCGAGTTGTGGGAACGTGCCGAGGCTATCGCTGCCGCGTGGCACGAGCA
GGGCATCCGTGACGGCGACTTCGTCGCTCAGTTGGGTTTCACCAGCACGGACTTCGCGTCGCTCGACGTCGCGGGATTGCGTCTGG
GCACCGTCTCGGTGCCCCTGCAGACGGGCGCGTCGCTGCAGCAGCGCAACGCGATTCTCGAAGAGACCCGGCCCGCAGTCTTTGCC
GCGAGTATCGAATACCTTGATGCCGCCGTCGATTCGGTGCTTGCGACCCCCTCGGTGCGACTCCTCTCGGTTTTCGACTATCACGC
GGAGGTCGACAGCCAGCGCGAAGCGCTGGAGGCTGTGCGGGCCCGGCTTGAGAGTGCCGGCCGGACGATCGTCGTCGAGGCCCTGG
CGGAGGCTCTCGCGCGGGGGCGGGACCTGCCCGCCGCGCCGCTGCCCAGTGCAGATCCCGATGCCTTGCGTCTGCTCATCTACACC
TCCGGCAGCACCGGTACCCCCAAGGGCGCCATGTATCCGCAATGGCTGGTCGCCAACTTGTGGCAGAAGAAGTGGCTCACCGACGA
TGTGATTCCGTCCATAGGCGTGAACTTCATGCCCATGAGCCACCTGGCGGGTCGCCTCACTCTCATGGGCACCCTTTCCGGTGGCG
GAACCGCCTACTACATCGCTTCGAGCGATCTTTCGACTTTCTTCGAGGACATCGCGCTCATCCGCCCCTCCGAAGTGCTCTTCGTG
CCGCGTGTGGTGGAGATGGTGTTCCAGCGTTTTCAGGCAGAATTGGACCGGTCCCTTGCCCCGGGTGAGAGCAACTCCGAGATCGC
GGAGCGAATCAAGGTCCGCATCCGGGAACAGGACTTCGGCGGGCGTGTGCTCAGTGCTGGCTCCGGGTCGGCCCCGTTGTCTCCTG
AGATGACGGAGTTCATGGAGTCGCTGCTGCAGGTGCCGTTGCGCGACGGGTATGGGTCCACCGAGGCCGGTGGTGTGTGGCGTGAC
GGAGTCCTGCAGCGTCCGCCCGTCACCGACTACAAGCTGGTTGACGTTCCGGAACTCGGATACTTCACCACAGATTCGCCGCATCC
CCGTGGCGAGCTGCGGTTGAAGTCGGAGACGATGTTCCCCGGCTACTACAAGCGCCCGGAGACCACTGCCGATGTCTTCGATGACG
AGGGGTACTACAAGACCGGTGACGTGGTCGCCGAGCTCGGGCCGGATCACCTCAAGTACCTCGACCGCGTCAAGAACGTCCTCAAG
CTCGCGCAGGGAGAGTTTGTCGCGGTGTCAAAGCTGGAGGCCGCTTACACCGGCAGCCCGCTGGTCCGGCAGATCTTTGTGTACGG
GAACAGTGAACGCTCGTTCCTGCTGGCTGTCGTGGTCCCGACACCCGAAGTCCTTGAGCGGTACGCAGATTCGCCAGATGCGCTCA
AGCCCTTGATCCAGGATTCGCTGCAGCAGGTCGCCAAGGACGCGGAGCTGCAATCCTATGAGATACCGCGCGACTTCATCGTTGAG
ACGGTGCCGTTCACCGTCGAGTCCGGATTGCTATCGGACGCGCGAAAGCTGCTGCGCCCCAAGCTGAAGGATCACTACGGAGAGAG
GCTGGAGGCGCTGTACGCCGAACTGGCGGAAAGCCAGAATGAGCGGCTGCGCCAGTTGGCCAGGGAGGCAGCCACGCGCCCGGTCC
TGGAGACGGTGACCGATGCGGCCGCCGCGCTGCTGGGCGCATCGTCCTCGGATCTGGCTCCTGATGTGCGATTCATCGACCTCGGT
GGCGACTCACTGTCGGCGCTGTCGTACTCCGAGCTGCTGCGCGACATCTTTGAGGTGGACGTTCCGGTGGGCGTCATCAACAGCGT
CGCCAACGACCTTGCCGCGATCGCCCGGCACATCGAGGCGCAGCGGACCGGCGCCGCTACGCAGCCGACCTTTGCGTCGGTCCACG
GCAAGGACGCGACGGTCATCACCGCCGGTGAACTCACCCTCGACAAGTTCTTGGACGAGTCACTGTTGAAAGCGGCCAAGGACGTT
CAGCCGGCAACGGCCGATGTCAAGACCGTTCTAGTGACCGGCGGCAACGGCTGGTTGGGTCGTTGGCTGGTGCTCGATTGGCTGGA
GCGGTTGGCACCCAATGGTGGCAAGGTCTACGCCCTCATTCGTGGCGCCGATGCCGAAGCAGCCCGGGCACGGTTGGACGCCGTGT
ACGAATCGGGTGATCCCAAGCTGTCCGCGCATTATCGTCAGCTGGCGCAACAGAGTCTGGAAGTTATCGCCGGCGATTTCGGCGAC
CAGGATCTCGGTCTATCCCAGGAAGTTTGGCAGAAGCTGGCCAAGGACGTGGACCTGATCGTGCACTCCGGTGCCTTGGTGAACCA
CGTGCTGCCGTACAGCCAGTTGTTCGGTCCGAATGTGGCGGGTACCGCCGAGATCATCAAGCTGGCAATTTCGGAGCGGCTCAAGC
CGGTCACCTACCTGTCGACGGTGGGCATCGCCGACCAGATTCCGGTGACGGAGTTCGAGGAAGACTCCGATGTTCGTGTGATGTCG
GCCGAGCGCCAGATCAATGACGGCTACGCGAACGGATACGGCAACTCAAAATGGGCCGGCGAGGTGCTGTTGCGGGAGGCTCATGA
CCTAGCGGGGCTGCCGGTGCGTGTGTTCCGCTCCGACATGATCCTGGCGCACAGTGACTACCACGGACAGCTCAACGTCACCGACG
TGTTCACCCGGAGCATCCAGAGTCTGCTGCTCACCGGTGTTGCACCGGCCAGCTTCTATGAATTGGATGCCGACGGCAATCGGCAG
CGCGCTCACTATGACGGTGTGCCCGGCGATTTCACCGCCGCATCGATCACCGCCATCGGCGGTGTGAACGTGGTAGACGGTTACCG
CAGCTTCGACGTGTTCAACCCGCACCATGACGGTGTCTCGATGGATACCTTCGTCGACTGGCTGATCGACGCAGGCTACAAGATCG
CGCGGATCGACGATTACGACCAGTGGCTCGCCCGGTTCGAGCTGGCCCTCAAGGGATTGCCCGAGCAGCAGCGGCAACAGTCGGTG
TTGCCACTTCTCAAGATGTACGAGAAGCCGCAACCGGCGATCGACGGAAGTGCACTTCCGACCGCAGAATTCAGTCGCGCCGTGCA
CGAGGCGAAGGTCGGAGACAGCGGTGAGATACCGCACGTCACCAAGGAGCTGATCCTCAAGTACGCCAGCGATATTCAGCTGTTGG
GCCTGGTG

[図3]


(配列番号３)
MTETISTAAVPTTDLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYGDRPALGQRAFEFVTGDDGATVIALKPEYTTVSYRE
LWERAEAIAAAWHEQGIRDGDFVAQLGFTSTDFASLDVAGLRLGTVSVPLQTGASLQQRNAILEETRPAVFAASIEYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYH
AEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPDALRLLIYTSGSTGTPKGAMYPQWLVANLWQKKRLTDDVIPSIGVNFMPMS
HLMGRLTLMGTLSGGGTAYYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLFVPRVVEMVFQRFQAELDRSLAPGESNSEIAERIKVRIREQDFGGRVLSAGSGSAPLS
PEMTEFMESLLQVPLRDGYGSTEAGGVWRDGVLQRPPVTDYKLVDVPELGYFTTDSPHPRGELRLKSETMFPGYYKRPETTADVFDDEGYYKTGDVVAEL
GPDHLKYLDRVKNVLKLAQGEFVAVSKLEAAYTGSPLVRQIFVYGNSERSFLLAVVVPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQQVAKDAELQSYEIPRDFI
VETVPFTVESGLLSDARKLLRPKLKDHYGERLEALYAELAESQNERLRQLAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSSDLAPDVRFIDLGGDSLSALSYSEL
LRDIFEVDVPVGVINSVANDLAAIARHIEAQRTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLDKFLDESLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVLD
WLERLAPNGGKVYALIRGADAEAARARLDAVYESGDPKLSAHYRQLAQQSLEVIAGDFGDQDLGLSQEVWQKLAKDVDLIVHSGALVNHVLPYSQLFGPN
VAGTAEIIKLAISERLKPVTYLSTVGIADQIPVTEFEEDSDVRVMSAERQINDGYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMILAHSDYHGQLN
VTDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVPGDFTAASITAIGGVNVVDGYRSFDVFNPHHDGVSMDTFVDWLIDAGYKIARIDDYDQWLA
RFELALKGLPEQQRQQSVLPLLKMYEKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAKVGDSGEIPHVTKELILKYASDIQLLGLV

[図4]


(配列番号４)
MTETISTAAVPTTDLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRLLEGYGDRPALGQRAFEFVTGDDGATVIALKPEYTTVSYRE
LWERAEAIAAAWHEQGIRDGDFVAQLGFTSTDFASLDVAGLRLGTVSVPLQTGASLQQRNAILEETRPAVFAASIEYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYH
AEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALARGRDLPAAPLPSADPDALRLLIYTSGSTGTPKGAMYPQWLVANLWQKKRLTDDVIPSIGVNFMPMS
HLAGRLTLMGTLSGGGTAYYIASSDLSTFFEDIAFIRPSEVLFVPRVVEMVFQRFQAELDRSLAPGESNSEIAERIKVRIREQDFGGRVLSAGSGSAPLS
PEMTEFMESLLGVPLRDGYGSTEAGGVWRDGVLQRPPVTDYKLVDVPELGYFTTDSPHPRGELRLKSETMFPGYYKRPETTADVFDDEGYYKTGDVVAEL
GPDHLKYLDRVKNVLKLAQGEFVAVSKLEAAYTGSPLVRQIFVYGNSERSFLLAVVVPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQQVAKDAELQSYEIPRDFI
VETVPFTVESGLLSDARKLLRPKLKDHYGERLEALYAELAESQNERLRQLAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSSDLAPDVRFIDLGGDSLSALSYSEL
LRDIFEVDVPVGVINSVANDLAAIARHIEAQRTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLDKFLDESLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVLD
WLERLAPNGGKVYALIRGADAEAARARLDAVYESGDPKLSAHYRQLAQQSLEVIAGDFGDQDLGLSQEVWQKLAKDVDLIVHSGALVNHVLPYSQLFGPN
VAGTAEIIKLAISERLKPVTYLSTVGIADQIPVTEFEEDSDVRVMSAERQINDGYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMILAHSDYHGQLN
VTDVFTRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVPGDFTAASITAIGGVNVVDGYRSFDVFNPHHDGVSMDTFVDWLIDAGYKIARIDDYDQWLA
RFELALKGLPEQQRQQSVLPLLKMYEKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAKVGDSGEIPHVTKELILKYASDIQLLGLV

[図5A]

（配列番号７２）

>WP_007468889.1 carboxylic acid reductase [Segniliparus rugosus]
MTESQSYETRQARPAGQSLAERVARLVAIDPQAAAAVPDKAVAERATQQGLRLAQRIEAFLSGYGDRPAL
AQRAFEITKDPITGRAVATLLPKFETVSYRELLERSHAIASELANHAEAPVKAGEFIATIGFTSTDYTSL
DIAGVLLGLTSVPLQTGATTDTLKAIAEETAPAVFGASVEHLDNAVTTALATPSVRRLLVFDYRQGVDED
REAVEAARSRLAEAGSAVLVDTLDEVIARGRALPRVALPPATDAGDDSLSLLIYTSGSTGTPKGAMYPER
NVAQFWGGIWHNAFDDGDSAPDVPDIMVNFMPLSHVAGRIGLMGTLSSGGTTYFIAKSDLSTFFEDYSLA
RPTKLFFVPRICEMIYQHYQSELDRIGAADGSPQAEAIKTELREKLLGGRVLTAGSGSAPMSPELTAFIE
SVLQVHLVDGYGSTEAGPVWRDRKLVKPPVTEHKLIDVPELGYFSTDSPYPRGELAIKTQTILPGYYKRP
ETTAEVFDEDGFYLTGDVVAEVAPEEFVYVDRRKNVLKLSQGEFVALSKLEAAYGTSPLVRQISVYGSSQ
RSYLLAVVVPTPEALAKYGDGEAVKSALGDSLQKIAREEGLQSYEVPRDFIIETDPFTIENGILSDAGKT
LRPKVKARYGERLEALYAQLAETQAGELRSIRVGAGERPVIETVQRAAAALLGASAAEVDPEAHFSDLGG
DSLSALTYSNFLHEIFQVEVPVSVIVSAANNLRSVAAHIEKERSSGSDRPTFASVHGAGATTIRASDLKL
EKFLDAQTLAAAPSLPRPASEVRTVLLTGSNGWLGRFLALAWLERLVPQGGKVVVIVRGKDDKAAKARLD
SVFESGDPALLAHYEDLADKGLEVLAGDFSDADLGLRKADWDRLADEVDLIVHSGALVNHVLPYSQLFGP
NVVGTAEVAKLALTKRLKPVTYLSTVAVAVGVEPSAFEEDGDIRDVSAVRSIDEGYANGYGNSKWAGEVL
LREAYEHAGLPVRVFRSDMILAHRKYTGQLNVPDQFTRLILSLLATGIAPKSFYQLDATGGRQRAHYDGI
PVDFTAEAITTLGLAGSDGYHSFDVFNPHHDGVGLDEFVDWLVEAGHPISRVDDYAEWLSRFETSLRGLP
EAQRQHSVLPLLHAFAQPAPAIDGSPFQTKNFQSSVQEAKVGAEHDIPHLDKALIVKYAEDIKQLGLL

[図5B-1]

```
Identity (61%)

配列番号 1          1     MTETISTAAVPTTDLEEQVKRRIEQVVSNDPQLAALLPEDSVTEAVNEPDLPLVEVIRRL  60
                           MTE+ S          + +  R+ ++V+ DPQ AA +P+ +V E   +  L L + I
S.S.Rugosus CAR     1     MTESQSYETRQARPAGQSLAERVARLVAIDPQAAAAVPDKAVAERATQQGLRLAQRIEAF  60

Query  61    LEGYGDRPALGQRAFEFVTGD--DGATVIALKPEYTTVSYRELWERAEAIAA--AWH-EQ  115
             L GYGDRPAL QRAFE +T D   G  V  L P++ TVSYREL ER+ AIA+  A H E
Sbjct  61    LSGYGDRPALAQRAFE-ITKDPITGRAVATLLPKFETVSYRELLERSHAIASELANHAEA  119

Query  116   GIRDGDFVAQLGFTSTDFASLDVAGLRLGTVSVPLQTGASLQQRNAILEETRPAVFAASI  175
              ++ G+F+A +GFTSTD+ SLD+AG+ LG  SVPLQTGA+     AI EET PAVF AS+
Sbjct  120   PVKAGEFIATIGFTSTDYTSLDIAGVLLGLTSVPLQTGATTDTLKAIAEETAPAVFGASV  179

Query  176   EYLDAAVDSVLATPSVRLLSVFDYHAEVDSQREALEAVRARLESAGRTIVVEALAEALAR  235
             E+LD AV + LATPSVR L VFDY   VD  REA+EA R+RL  AG  ++V+ L E +AR
Sbjct  180   EHLDNAVTTALATPSVRRLLVFDYRQGVDEDREAVEAARSRLAEAGSAVLVDTLDEVIAR  239

Query  236   GRDLPAAPLP---SADPDALRLLIYTSGSTGTPKGAMYPQWLVANLWQK--KRLTDDV--  288
             GR LP   LP    A  D+L LLIYTSGSTGTPKGAMYP+  VA  W        DD
Sbjct  240   GRALPRVALPPATDAGDDSLSLLIYTSGSTGTPKGAMYPERNVAQFWGGIWHNAFDDGDS  299

Query  289   ---IPSIGVNFMPMSHLMGRLTLMGTLSGGGTAYYIASSDLSTFFEDIALIRPSEVLFVP  345
                +P I VNFMP+SH+ GR+ LMGTLS GGT Y+IA SDLSTFFED +L RP+++ FVP
Sbjct  300   APDVPDIMVNFMPLSHVAGRIGLMGTLSSGGTTYFIAKSDLSTFFEDYSLARPTKLFFVP  359

Query  346   RVVEMVFQRFQAELDRSLAPGESNSEIAERIKVRIREQDFGGRVLSAGSGSAPLSPEMTE  405
             R+ EM++Q +Q+ELDR  A     S  AE IK  +RE+  GGRVL+AGSGSAP+SPE+T
Sbjct  360   RICEMIYQHYQSELDRIGA--ADGSPQAEAIKTELREKLLGGRVLTAGSGSAPMSPELTA  417

Query  406   FMESLLQVPLRDGYGSTEAGGVWRDGVLQRPPVTDYKLVDVPELGYFTTDSPHPRGELRL  465
             F+ES+LQV L DGYGSTEAG VWRD  L +PPVT++KL+DVPELGYF+TDSP+PRGEL +
Sbjct  418   FIESVLQVHLVDGYGSTEAGPVWRDRKLVKPPVTEHKLIDVPELGYFSTDSPYPRGELAI  477

Query  466   KSETMFPGYYKRPETTADVFDDEGYYKTGDVVAELGPDHLKYLDRVKNVLKLAQGEFVAV  525
             K++T+ PGYYKRPETTA+VFD++G+Y TGDVVAE+ P+   Y+DR KNVLKL+QGEFVA+
Sbjct  478   KTQTILPGYYKRPETTAEVFDEDGFYLTGDVVAEVAPEEFVYVDRRKNVLKLSQGEFVAL  537
```

[図5B-2]

（続き）

```
Query  526   SKLEAAYTGSPLVRQIFVYGNSERSFLLAVVVPTPEVLERYADSPDALKPLIQDSLQQVA  585
             SKLEAAY  SPLVRQI VYG+S+RS+LLAVVVPTPE L +Y D  +A+K  + DSLQ++A
Sbjct  538   SKLEAAYGTSPLVRQISVYGSSQRSYLLAVVVPTPEALAKYGDG-EAVKSALGDSLQKIA  596

Query  586   KDAELQSYEIPRDFIVETVPFTVESGLLSDARKLLRPKLKDHYGERLEALYAELAESQNE  645
             ++  LQSYE+PRDFI+ET PFT+E+G+LSDA K LRPK+K  YGERLEALYA+LAE+Q
Sbjct  597   REEGLQSYEVPRDFIIETDPFTIENGILSDAGKTLRPKVKARYGERLEALYAQLAETQAG  656

Query  646   RLRQLAREAATRPVLETVTDAAAALLGASSSDLAPDVRFIDLGGDSLSALSYSELLRDIF  705
              LR +   A  RPV+ETV  AAAALLGAS++++ P+  F DLGGDSLSAL+YS  L +IF
Sbjct  657   ELRSIRVGAGERPVIETVQRAAAALLGASAAEVDPEAHFSDLGGDSLSALTYSNFLHEIF  716

Query  706   EVDVPVGVINSVANDLAAIARHIEAQRTGAATQPTFASVHGKDATVITAGELTLDKFLDE  765
             +V+VPV VI S AN+L ++A HIE +R+  + +PTFASVHG  AT I A +L L+KFLD
Sbjct  717   QVEVPVSVIVSAANNLRSVAAHIEKERSSGSDRPTFASVHGAGATTIRASDLKLEKFLDA  776

Query  766   SLLKAAKDVQPATADVKTVLVTGGNGWLGRWLVLDWLERLAPNGGKVYALIRGADAEAAR  825
               L AA  +    ++V+TVL+TG NGWLGR+L L WLERL P GGKV  ++RG D +AA+
Sbjct  777   QTLAAAPSLPRPASEVRTVLLTGSNGWLGRFLALAWLERLVPQGGKVVVIVRGKDDKAAK  836

Query  826   ARLDAVYESGDPKLSAHYRQLAQQSLEVIAGDFGDQDLGLSQEVWQKLAKDVDLIVHSGA  885
             ARLD+V+ESGDP L AHY  LA + LEV+AGDF D DLGL +  W +LA +VDLIVHSGA
Sbjct  837   ARLDSVFESGDPALLAHYEDLADKGLEVLAGDFSDADLGLRKADWDRLADEVDLIVHSGA  896

Query  886   LVNHVLPYSQLFGPNVAGTAEIIKLAISERLKPVTYLSTVGIADQIPVTEFEEDSDVRVM  945
             LVNHVLPYSQLFGPNV GTAE+ KLA+++RLKPVTYLSTV +A  +  + FEED D+R +
Sbjct  897   LVNHVLPYSQLFGPNVVGTAEVAKLALTKRLKPVTYLSTVAVAVGVEPSAFEEDGDIRDV  956

Query  946   SAERQINDGYANGYGNSKWAGEVLLREAHDLAGLPVRVFRSDMILAHSDYHGQLNVTDVF  1005
             SA R I++GYANGYGNSKWAGEVLLREA++ AGLPVRVFRSDMILAH  Y GQLNV D F
Sbjct  957   SAVRSIDEGYANGYGNSKWAGEVLLREAYEHAGLPVRVFRSDMILAHRKYTGQLNVPDQF  1016

Query  1006  TRSIQSLLLTGVAPASFYELDADGNRQRAHYDGVPGDFTAASITAIGGVNVVDGYRSFDV  1065
             TR I SLL TG+AP SFY+LDA G RQRAHYDG+P DFTA +IT + G+   DGY SFDV
Sbjct  1017  TRLILSLLATGIAPKSFYQLDATGGRQRAHYDGIPVDFTAEAITTL-GLAGSDGYHSFDV  1075

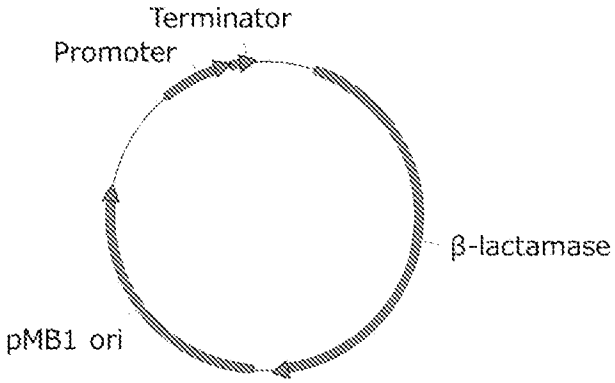
Query  1066  FNPHHDGVSMDTFVDWLIDAGYKIARIDDYDQWLARFELALKGLPEQQRQQSVLPLLKMY  1125
             FNPHHDGV +D FVDWL++AG+ I+R+DDY +WL+RFE +L+GLPE QRQ SVLPLL  +
Sbjct  1076  FNPHHDGVGLDEFVDWLVEAGHPISRVDDYAEWLSRFETSLRGLPEAQRQHSVLPLLHAF  1135

Query  1126  EKPQPAIDGSALPTAEFSRAVHEAKVGDSGEIPHVTKELILKYASDIQLLGLV  1178
              +P PAIDGS   T  F  +V EAKVG   +IPH+ K LI+KYA DI+ LGL+
Sbjct  1136  AQPAPAIDGSPFQTKNFQSSVQEAKVGAEHDIPHLDKALIVKYAEDIKQLGLL  1188
```

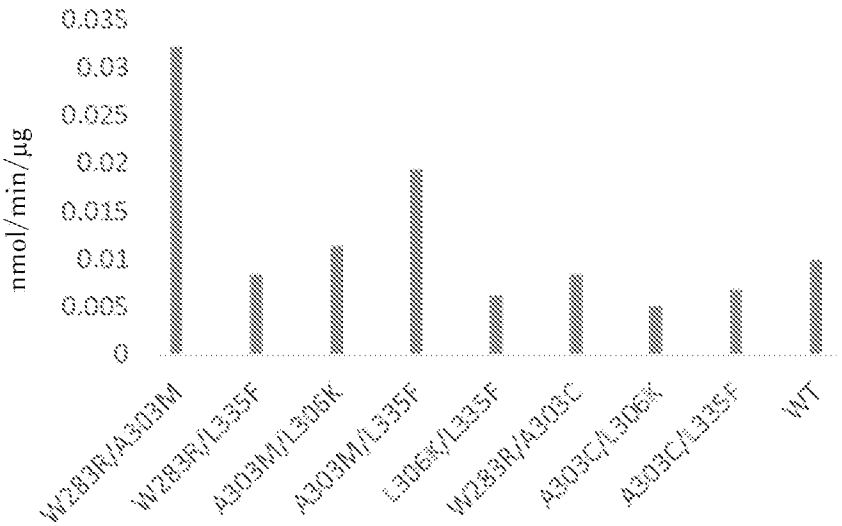
[図5C]

	アミノ酸番号		アミノ酸番号
配列番号 1	61	LEGYGDRPALGQRAFEFVTGD--DGATVIALKPEYTTVSYRELWERAEAIAA--AWH-EQ	115
		L GYGDRPAL QRAFE +T D G V L P++ TVSYREL ER+ AIA+ A H E	
S. Rugosus CAR	61	LSGYGDRPALAQRAFE-ITKDPITGRAVATLLPKFETVSYRELLERSHAIASELANHAEA	119

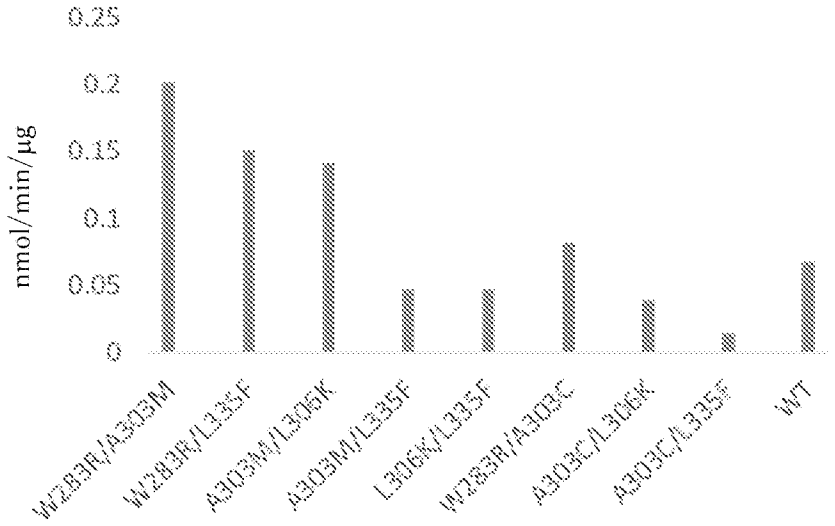
[図6]



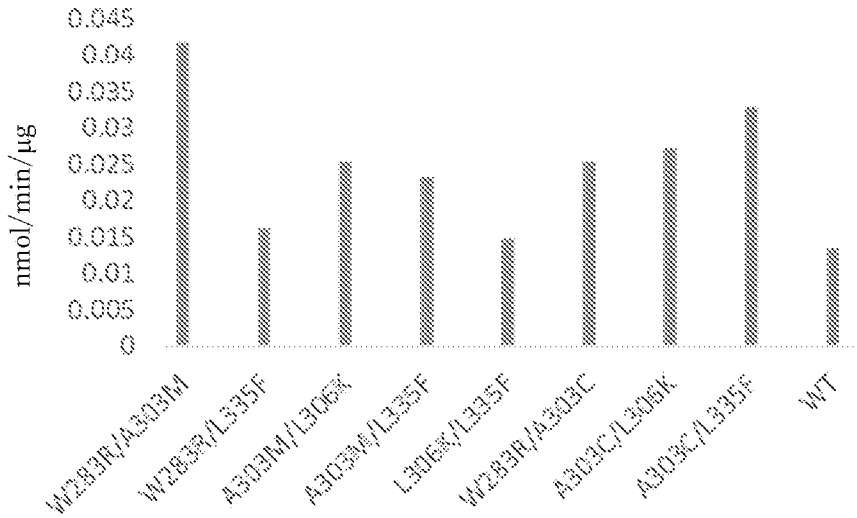
[図7A]



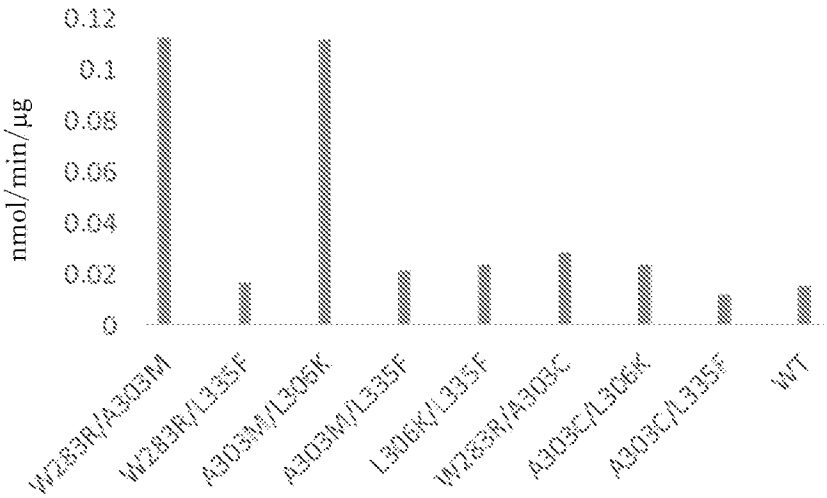
[図7B]


0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
nmol/min/μg
W283R/A303M
W283R/L335F
A303M/L306K
A303M/L335F
L306K/L335F
W283R/A303C
A303C/L306K
A303C/L335F
WT

[図7C]


0.045
0.04
0.035
0.03
0.025
0.02
0.015
0.01
0.005
0
nmol/min/μg
W283R/A303M
W283R/L335F
A303M/L306K
A303M/L335F
L306K/L335F
W283R/A303C
A303C/L306K
A303C/L335F
WT

[図7D]


0.12
0.1
0.08
0.06
0.04
0.02
0
nmol/min/μg
W283R/A303M
W283R/L335F
A303M/L306K
A303M/L335F
L306K/L335F
W283R/A303C
A303C/L306K
A303C/L335F
WT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/010912

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/53(2006.01)i; ***C12N 1/15***(2006.01)i; ***C12N 1/19***(2006.01)i; ***C12N 1/21***(2006.01)i; ***C12N 5/10***(2006.01)i; ***C12N 9/02***(2006.01)i; ***C12N 15/31***(2006.01)i; ***C12N 15/63***(2006.01)i; ***C12P 7/02***(2006.01)i; ***C12P 7/24***(2006.01)i; ***C12P 13/00***(2006.01)i; *C12N 15/10*(2006.01)n

FI: C12N15/53 ZNA; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/02; C12N15/31; C12N15/63 Z; C12P7/02; C12P7/24; C12P13/00; C12N15/10 200Z

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/53; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/02; C12N15/31; C12N15/63; C12P7/02; C12P7/24; C12P13/00; C12N15/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	FEDORCHUK, T. P. et al. One-Pot Biocatalytic Transformation of Adipic Acid to 6-Aminocaproic Acid and 1, 6-Hexamethylenediamine Using Carboxylic Acid Reductases and Transaminases. Journal of the American Chemical Society. 30 December 2019, vol. 142, no. 2, pp. 1038-1048 p. 1039, right column, last paragraph, p. 1040, left column, Gene Cloning and Protein Purification, fig. 1, 5E, 6	1-2, 7-20, 22
Y		1-22
X	FEDORCHUK, T. P. et al. Site-directed mutagenesis and stability of the carboxylic acid reductase MAB4714 from Mycobacterium abscessus. Journal of Biotechnology. 02 August 2019, vol. 303, pp. 72-79 p. 74, left column, Gene cloning and protein purification, fig. 1, 5	1-2, 7-20
Y		1-22

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
15 April 2022	**26 April 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/010912

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-512645 A (REG LIFE SCIENCES, LLC) 30 April 2015 (2015-04-30) claims, paragraph [0127]	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/010912

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/010912

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2015-512645 A	30 April 2015	US 2015/0064757 A1 claims, paragraph [0148] WO 2013/152052 A2 EP 2834350 A2 CN 104704113 A KR 10-2017-0113710 A	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/010912

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 15/53(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i; C12N 15/31(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 7/02(2006.01)i; C12P 7/24(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; C12N 15/10(2006.01)n
FI: C12N15/53 ZNA; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/02; C12N15/31; C12N15/63 Z; C12P7/02; C12P7/24; C12P13/00; C12N15/10 200Z

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N15/53; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N9/02; C12N15/31; C12N15/63; C12P7/02; C12P7/24; C12P13/00; C12N15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY (STN); GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq; UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	FEDORCHUK, T. P. et al., One-pot biocatalytic transformation of adipic acid to 6-aminocaproic acid and 1, 6-hexamethylenediamine using carboxylic acid reductases and transaminases, Journal of the American Chemical Society, 2019.12.30, Vol. 142, No. 2, pp. 1038-1048 １０３９ページ右欄最終段落、１０４０ページ左欄Ｇｅｎｅ Ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ、図１、５Ｅ、６	１－２、７－２０、２２
Y		１－２２
X	FEDORCHUK, T. P. et al., Site-directed mutagenesis and stability of the carboxylic acid reductase MAB4714 from Mycobacterium abscessus, Journal of Biotechnology, 2019.08.02, Vol. 303, pp. 72-79 ７４ページ左欄Ｇｅｎｅ ｃｌｏｎｉｎｇ ａｎｄ ｐｒｏｔｅｉｎ ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ、図１、５	１－２、７－２０
Y		１－２２

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
15.04.2022	26.04.2022

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）
松原　寛子 4B 2564

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
Y	JP 2015-512645 A (アールイージー　ライフ　サイエンシズ　リミテッド　ライアビリティ　カンパニー) 30.04.2015 (2015-04-30) 特許請求の範囲、［０１２７］	１－２２

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/010912

第Ⅰ欄　　ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第１ページの１．ｃの続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

a. ☑ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
　☑ 附属書C/ST.25テキストファイル形式
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式

b. ☐ 国際出願とともに、ＰＣＴ規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表

c. ☐ 国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
　☐ 附属書C/ST.25テキストファイル形式(ＰＣＴ規則13の3.1(a))
　☐ 紙形式又はイメージファイル形式（ＰＣＴ規則13の3.1(b)及びＰＣＴ実施細則第713号）

2. ☐ さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見:

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/010912

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2015-512645 A	30.04.2015	US 2015/0064757 A1 claims, [0148] WO 2013/152052 A2 EP 2834350 A2 CN 104704113 A KR 10-2017-0113710 A	