

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-51207

(P2010-51207A)

(43) 公開日 平成22年3月11日(2010.3.11)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 A	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/06 (2006.01)	C 1 2 N 9/06 Z N A Z	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 請求項の数 11 O L (全 22 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-218142 (P2008-218142)	(71) 出願人	000006035
(22) 出願日	平成20年8月27日 (2008.8.27)		三菱レイヨン株式会社
特許法第30条第1項適用申請有り 第60回 日本生物工学会大会2008年度大会講演要旨集			東京都港区港南一丁目6番41号
		(71) 出願人	000236920
			富山県
			富山県富山市新総曲輪1番7号
		(74) 代理人	100092783
			弁理士 小林 浩
		(74) 代理人	100095360
			弁理士 片山 英二
		(74) 代理人	100120134
			弁理士 大森 規雄
		(74) 代理人	100104282
			弁理士 鈴木 康仁
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 キヌクリジノン還元酵素及びそれを用いた光学活性3-キヌクリジノールの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 キヌクリジノン還元酵素の提供。

【解決手段】 下記の理化学的性質を有する、キヌクリジノン還元酵素。

(i) 分子量：

ゲルろ過法による測定値： 70,000 ~ 73,000Da

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定値： 29,500 ~ 31,500Da

(ii) 至適pH：6.0 ~ 8.0

(iii) 補酵素としてNADH又はその誘導体を必要とする

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

下記の理化学的性質を有する、キヌクリジノン還元酵素。

(i) 分子量：

ゲルろ過法による測定値：70,000～73,000Da

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定値：29,500～31,500Da

(ii) 至適pH：6.0～8.0

(iii) 補酵素としてNADH又はその誘導体を必要とする

【請求項 2】

3 - キヌクリジノンに特異的に作用し、3 - キヌクリジノールを生成する触媒活性を有する、請求項1に記載のキヌクリジノン還元酵素。 10

【請求項 3】

以下の(a)、(b)又は(c)のタンパク質を含むキヌクリジノン還元酵素。

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

(c) 配列番号2に示すアミノ酸配列と96%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

【請求項 4】

キヌクリジノン還元酵素が、ミクロバクテリウム(Microbacterium)属に属する微生物由来のものである請求項1～3のいずれか1項に記載のキヌクリジノン還元酵素。 20

【請求項 5】

ミクロバクテリウム(Microbacterium)属に属する微生物が、Microbacterium luteolum JCM 9174、Microbacterium estevoaromaticum IFO 3751及びMicrobacterium arabinogalactanolyticum JCM9171からなる群から選ばれる少なくとも一種である、請求項4に記載のキヌクリジノン還元酵素。

【請求項 6】

以下の(a)、(b)又は(c)のタンパク質をコードするキヌクリジノン還元酵素遺伝子。 30

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

(c) 配列番号2に示すアミノ酸配列と96%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

【請求項 7】

以下の(d)又は(e)に示すポリヌクレオチドを含むキヌクリジノン還元酵素遺伝子。

(d) 配列番号1に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド 40

(e) 配列番号1に示す塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

【請求項 8】

請求項6又は7に記載のキヌクリジノン還元酵素遺伝子を含有する組換えベクター。

【請求項 9】

請求項8に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

【請求項 10】

請求項9に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からキヌクリジノン還元酵素を採取することを特徴とする、キヌクリジノン還元酵素の製造方法。 50

【請求項 11】

請求項1～5のいずれか1項に記載のキヌクリジノン還元酵素、該酵素を産生する微生物若しくは請求項9に記載の形質転換体、又は前記微生物若しくは形質転換体の処理物を、3-キヌクリジノン又はその塩に作用させる工程を含む、R-3-キヌクリジノール又はその塩の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、有用且つ新規なキヌクリジノン還元酵素及びその遺伝子に関する。また、本発明は、当該キヌクリジノン還元酵素を製造するために使用されるベクター及び形質転換体に関する。さらに、本発明は当該キヌクリジノン還元酵素を用いた光学活性3-キヌクリジノール又はその塩を製造する方法に関する。

10

【背景技術】

【0002】

3-キヌクリジノンの還元生成物である光学活性3-キヌクリジノールは、スクアレニンターゼ阻害作用を有する動脈硬化の治療剤、またはムスカリン受容体拮抗作用を有する気管支拡張剤および胃腸運動抑制剤などの合成中間体として知られる化合物である。

当該光学活性3-キヌクリジノールの製造方法としては、化学合成法、エステル加水分解法、酵素還元法等が知られている。

【0003】

20

化学合成法としては、ロジウム錯化合物を触媒としてルイス酸付加物を不斉還元することにより、3-キヌクリジノンから光学活性3-キヌクリジノールを製造する方法が報告されている（特許文献11）。しかしこの方法は光学純度が低く、工業的に有利な製造方法とは言い難い。また、光学活性酒石酸等を分割剤とする優先晶析法により光学活性3-キヌクリジノール誘導体に導く方法が報告されている（非特許文献1）。しかし、ラセミ体を出発原料とし、光学分割して目的の光学異性体を得る手法であるので、対掌体が残存するため、生産コストが高くなる傾向にある。

【0004】

エステル加水分解法としては、3-キヌクリジノールの低級脂肪酸エステルを微生物由来の酵素により不斉加水分解して光学活性3-キヌクリジノールに分割する方法が知られている（特許文献8～10及び非特許文献2）。この方法もラセミ体を出発原料とし、光学分割して目的の光学異性体を得る手法であるので、対掌体が残存するため、生産コストが高くなる傾向にある。

30

【0005】

酵素還元法としては、微生物菌体を利用した酵素不斉還元による方法が知られている（特許文献1～4）。しかし、特許文献1～4に記載された菌体を用いた反応は、菌体由来の不純物又は菌体内の他の酵素による副反応等が生じることがあるため、さらに効率よく生成物を単離できる方法が望まれていた。また、ロドトルーラ属に属する微生物より産生された酵素を用いる方法も知られている（特許文献6）。しかし、この酵素は、高価なNADPH（還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）を補酵素とするものであり、コストが高くなる。さらに、酵素を用いた不斉還元による光学活性3-キヌクリジノールの他の製造法として、トロピノンを還元する活性を持つ酵素とケトンに作用させる方法が提案されている（特許文献7）。しかし、トロピノンを還元する酵素は植物体由来のものが多く、植物体からの酵素製造は、コスト高となる。微生物を宿主として製造する場合には、酵素を高発現させることが困難な場合も多いなど工業的に酵素を製造することが困難である。

40

【0006】

一方、本発明者も、ミクロバクテリウム（Microbacterium）属に属する微生物より、3-キヌクリジノン又はその塩を還元し、R-3-キヌクリジノール又はその塩を生成する新規な酵素を見出している（特許文献5）。当該酵素は、SDS-PAGEで測定した場

50

合の分子量が約52,000であり、ゲル濾過で測定した場合の分子量は約220,000であり、NADH（還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）を補酵素として必要とする。また、当該酵素は3-キヌクリジノン以外にも、トロピノン、N-メチル-4-ピペリジノン、6-ヒドロキシトロピノン、4-ピペリドン、テトラヒドロチオピラン-4-オン、4-メチルシクロヘキサノン、3-メチルシクロヘキサノン、2-メチルシクロヘキサノンなどにも作用して対応するアルコールを生成する。さらに種々のアルデヒド化合物に対しても高い活性を示す。このように広範な基質に対して高い活性を示す酵素は、原料に混在する3-キヌクリジノン以外の類似化合物を対応するアルコールへと変換させてしまうために、後工程での不純物分離に多大な労力を要し、工業的な生産には不利である。よって基質特異性の高い酵素の取得が強く求められていた。

10

【非特許文献1】Acta. Pharm. Suec., 16,281-3 (1979)

【非特許文献2】Life Sic. 21, 1293-1302 (1977)

【特許文献1】特開平10-243795号公報

【特許文献2】特開平11-196890号公報

【特許文献3】特開2000-245495号公報

【特許文献4】特開2002-153293号公報

【特許文献5】特開2003-334069号公報

【特許文献6】特開2007-124922号公報

【特許文献7】特開2003-230398号公報

【特許文献8】米国特許第5,215,918号公報

20

【特許文献9】特開平10-136995号公報

【特許文献10】特開平10-210997号公報

【特許文献11】特開平9-194480号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、新規なキヌクリジノン還元酵素及びその遺伝子を提供することである。また、本発明の目的は、当該酵素による不斉還元反応により、医薬品合成中間体として有用な光学活性3-キヌクリジノール又はその塩の工業的に有利な製造方法を提供することである。

30

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、ミクロバクテリウム（Microbacterium）属に属する微生物が新規なキヌクリジノン還元酵素を産生し、この酵素が低コストかつ工業的に使用可能であることを見だし、本発明を完成するに至った。

【0009】

すなわち、本発明は以下の通りである。

（1）下記の理化学的性質を有する、キヌクリジノン還元酵素。

（i）分子量：

ゲルろ過法による測定値：70,000～73,000Da

40

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による測定値：29,500～31,500Da

（ii）至適pH：6.0～8.0

（iii）補酵素としてNADH又はその誘導体を必要とする

（2）3-キヌクリジノンに特異的に作用し、3-キヌクリジノールを生成する触媒活性を有する、（1）に記載のキヌクリジノン還元酵素。

（3）以下の（a）、（b）又は（c）のタンパク質を含むキヌクリジノン還元酵素。

（a）配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

（b）配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

50

(c) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と96%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

(4) キヌクリジノン還元酵素が、ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属に属する微生物由来のものである (1) ~ (3) のいずれか 1 項に記載のキヌクリジノン還元酵素。

(5) ミクロバクテリウム (Microbacterium) 属に属する微生物が、Microbacterium luteolum JCM 9174、Microbacterium estevoaromaticum IFO 3751 及び Microbacterium arabinogalactanolyticum JCM9171 からなる群から選ばれる少なくとも一種である、(4) に記載のキヌクリジノン還元酵素。

(6) 以下の (a)、(b) 又は (c) のタンパク質をコードするキヌクリジノン還元酵素遺伝子。

(a) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

(c) 配列番号 2 に示すアミノ酸配列と96%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

(7) 以下の (d) 又は (e) に示すポリヌクレオチドを含むキヌクリジノン還元酵素遺伝子。

(d) 配列番号 1 に示す塩基配列からなるポリヌクレオチド

(e) 配列番号 1 に示す塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(8) 上記 (6) 又は (7) に記載のキヌクリジノン還元酵素遺伝子を含有する組換えベクター。

(9) 上記 (8) に記載の組換えベクターを含む形質転換体。

(10) 上記 (9) に記載の形質転換体を培養し、得られる培養物からキヌクリジノン還元酵素を採取することの特徴とする、キヌクリジノン還元酵素の製造方法。

(11) 上記 (1) ~ (5) のいずれか 1 項に記載のキヌクリジノン還元酵素、該酵素を産生する微生物若しくは (9) に記載の形質転換体、又は前記微生物若しくは形質転換体の処理物を、3-キヌクリジノン又はその塩に作用させる工程を含む、R-3-キヌクリジノール又はその塩の製造方法。

【発明の効果】

【0010】

本発明により、キヌクリジノンに特異的に作用し、医薬品合成中間体等として重要な R-3-キヌクリジノールを製造する触媒活性を有するキヌクリジノン還元酵素が得られ、また、当該酵素を利用して R-3-キヌクリジノールの効率的な生産が可能となる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明に係るキヌクリジノン還元酵素

本発明の酵素はキヌクリジノン還元酵素であり、例えば NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) を補酵素として、3-キヌクリジノンあるいはその塩を還元し、R-3-キヌクリジノールを生成する触媒作用を有する。本発明の酵素の理化学的性質及び特徴を以下に示す。

(イ) 分子量

本発明の酵素の分子量は、SDS-PAGE で測定した場合、29.5 ~ 31.5 kDa 程度、好ましくは約 31 kDa である。また、ゲル濾過 (高速液体クロマトグラフィー) で測定した場合の分子量は、約 70 ~ 73 kDa、好ましくは、約 71.8 kDa である。

(ロ) 至適 pH

本発明のキヌクリジノン還元酵素は、至適 pH が 6.0 から 8.0 程度、特に、3-キヌクリ

10

20

30

40

50

ジノンを基質とした場合の至適pHは6.0から8.0程度である。より好ましくは至適pHが6.5～7.5程度である。

(ハ) 基質特異性

本発明のキヌクリジノン還元酵素は、3 - キヌクリジノンに特異的に作用し、3 - キヌクリジノールを生成する触媒活性を有する。「3 - キヌクリジノンに特異的に作用」するとは、3 - キヌクリジノンには作用するが、ほかの化合物、例えば3 - キヌクリジノンに類似した化合物には実質的には作用しないことをいう。

ここで、「3 - キヌクリジノンに類似した化合物」とは、例えば、トロピノン、N-メチル-4-ピペリジノン、6-ヒドロキシトロピノン、4-ピペリドン、テトラヒドロチオピラン-4-オン、4-メチルシクロヘキサノン、3-メチルシクロヘキサノン、2-メチルシクロヘキサ
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
8110
8120
8130
8140
8150
8160
8170
8180
8190
8200
8210
8220
8230
8240
8250
8260
8270
8280
8290
8300
8310
8320
8330
8340
8350
8360
8370
8380
8390
8400
8410
8420
8430
8440
8450
8460
8470
8480
8490
8500
8510
8520
8530
8540
8550
8560
8570
8580
8590
8600
8610
8620
8630
8640
8650
8660
8670
8680
8690
8700
8710
8720
8730
8740
8750
8760
8770
8780
8790
8800
8810
8820
8830
8840
8850
8860
8870
8880
8890
8900
8910
8920
8930
8940
8950
8960
8970
8980
8990
9000
9010
9020
9030
9040
9050
9060
9070
9080
9090
9100
9110
9120
9130
9140
9150
9160
9170
9180
9190
9200
9210
9220
9230
9240
9250
9260
9270
9280
9290
9300
9310
9320
9330
9340
9350
9360
9370
9380
9390
9400
9410
9420
9430
9440
9450
9460
9470
9480
9490
9500
9510
9520
9530
9540
9550
9560
9570
9580
9590
9600
9610
9620
9630
9640
9650
9660
9670
9680
9690
9700
9710
9720
9730
9740
9750
9760
9770
9780
9790
9800
9810
9820
9830
9840
9850
9860
9870
9880
9890
9900
9910
9920
9930
9940
9950
9960
9970
9980
9990
10000

【0012】

(ニ) 補酵素

本発明において、補酵素とは、酵素のタンパク質部分と可逆的に結合して酵素作用の発現に寄与する補欠分子族を意味し、本発明の酵素が特異的にR - 3 - キヌクリジノールを生成する触媒作用に寄与するものをいう。

補酵素としては、本発明に係る酵素が特異的にR - 3 - キヌクリジノールを生成することができれば特に限定されないが、例えば、NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド) 又はその誘導体が好ましい。NADH以外の補酵素は、R - 3 - キヌクリジノールの生成能を発揮することができる限り特に限定されるものではないが、NADH依存性であることが望ましい。NADHの誘導体は、R - 3 - キヌクリジノールを特異的に生成することができれば特に限定されず、例えばNADPHなどが挙げられる。

補酵素は、本発明においてR - 3 - キヌクリジノールを生成させる酵素反応を行う際に、当業者が適宜選択することができる。

(ホ) アミノ酸配列

本発明のキヌクリジノン還元酵素は、以下の(a)、(b)又は(c)のタンパク質を含むものである。

(a) 配列番号2に示すアミノ酸配列からなるタンパク質

(b) 配列番号2に示すアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加してなるアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

(c) 配列番号2に示すアミノ酸配列と96%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質

上記のとおり、本発明のキヌクリジノン還元酵素には、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、置換若しくは付加され、又はそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列からなり、かつ、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質も含まれる。

【0013】

配列番号2で示されるアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が、欠失、置換、若しくは付加され、又はそれらの組合せにより変異されたアミノ酸配列としては、例えば、

(i) 配列番号2で示されるアミノ酸配列中の1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)のアミノ酸が欠失したアミノ酸配列、

(ii) 配列番号2で示されるアミノ酸配列中の1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されたアミノ酸配列、

(iii) 配列番号2で示されるアミノ酸配列に1～9個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)のアミノ酸が付加したアミ
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150
160
170
180
190
200
210
220
230
240
250
260
270
280
290
300
310
320
330
340
350
360
370
380
390
400
410
420
430
440
450
460
470
480
490
500
510
520
530
540
550
560
570
580
590
600
610
620
630
640
650
660
670
680
690
700
710
720
730
740
750
760
770
780
790
800
810
820
830
840
850
860
870
880
890
900
910
920
930
940
950
960
970
980
990
1000
1010
1020
1030
1040
1050
1060
1070
1080
1090
1100
1110
1120
1130
1140
1150
1160
1170
1180
1190
1200
1210
1220
1230
1240
1250
1260
1270
1280
1290
1300
1310
1320
1330
1340
1350
1360
1370
1380
1390
1400
1410
1420
1430
1440
1450
1460
1470
1480
1490
1500
1510
1520
1530
1540
1550
1560
1570
1580
1590
1600
1610
1620
1630
1640
1650
1660
1670
1680
1690
1700
1710
1720
1730
1740
1750
1760
1770
1780
1790
1800
1810
1820
1830
1840
1850
1860
1870
1880
1890
1900
1910
1920
1930
1940
1950
1960
1970
1980
1990
2000
2010
2020
2030
2040
2050
2060
2070
2080
2090
2100
2110
2120
2130
2140
2150
2160
2170
2180
2190
2200
2210
2220
2230
2240
2250
2260
2270
2280
2290
2300
2310
2320
2330
2340
2350
2360
2370
2380
2390
2400
2410
2420
2430
2440
2450
2460
2470
2480
2490
2500
2510
2520
2530
2540
2550
2560
2570
2580
2590
2600
2610
2620
2630
2640
2650
2660
2670
2680
2690
2700
2710
2720
2730
2740
2750
2760
2770
2780
2790
2800
2810
2820
2830
2840
2850
2860
2870
2880
2890
2900
2910
2920
2930
2940
2950
2960
2970
2980
2990
3000
3010
3020
3030
3040
3050
3060
3070
3080
3090
3100
3110
3120
3130
3140
3150
3160
3170
3180
3190
3200
3210
3220
3230
3240
3250
3260
3270
3280
3290
3300
3310
3320
3330
3340
3350
3360
3370
3380
3390
3400
3410
3420
3430
3440
3450
3460
3470
3480
3490
3500
3510
3520
3530
3540
3550
3560
3570
3580
3590
3600
3610
3620
3630
3640
3650
3660
3670
3680
3690
3700
3710
3720
3730
3740
3750
3760
3770
3780
3790
3800
3810
3820
3830
3840
3850
3860
3870
3880
3890
3900
3910
3920
3930
3940
3950
3960
3970
3980
3990
4000
4010
4020
4030
4040
4050
4060
4070
4080
4090
4100
4110
4120
4130
4140
4150
4160
4170
4180
4190
4200
4210
4220
4230
4240
4250
4260
4270
4280
4290
4300
4310
4320
4330
4340
4350
4360
4370
4380
4390
4400
4410
4420
4430
4440
4450
4460
4470
4480
4490
4500
4510
4520
4530
4540
4550
4560
4570
4580
4590
4600
4610
4620
4630
4640
4650
4660
4670
4680
4690
4700
4710
4720
4730
4740
4750
4760
4770
4780
4790
4800
4810
4820
4830
4840
4850
4860
4870
4880
4890
4900
4910
4920
4930
4940
4950
4960
4970
4980
4990
5000
5010
5020
5030
5040
5050
5060
5070
5080
5090
5100
5110
5120
5130
5140
5150
5160
5170
5180
5190
5200
5210
5220
5230
5240
5250
5260
5270
5280
5290
5300
5310
5320
5330
5340
5350
5360
5370
5380
5390
5400
5410
5420
5430
5440
5450
5460
5470
5480
5490
5500
5510
5520
5530
5540
5550
5560
5570
5580
5590
5600
5610
5620
5630
5640
5650
5660
5670
5680
5690
5700
5710
5720
5730
5740
5750
5760
5770
5780
5790
5800
5810
5820
5830
5840
5850
5860
5870
5880
5890
5900
5910
5920
5930
5940
5950
5960
5970
5980
5990
6000
6010
6020
6030
6040
6050
6060
6070
6080
6090
6100
6110
6120
6130
6140
6150
6160
6170
6180
6190
6200
6210
6220
6230
6240
6250
6260
6270
6280
6290
6300
6310
6320
6330
6340
6350
6360
6370
6380
6390
6400
6410
6420
6430
6440
6450
6460
6470
6480
6490
6500
6510
6520
6530
6540
6550
6560
6570
6580
6590
6600
6610
6620
6630
6640
6650
6660
6670
6680
6690
6700
6710
6720
6730
6740
6750
6760
6770
6780
6790
6800
6810
6820
6830
6840
6850
6860
6870
6880
6890
6900
6910
6920
6930
6940
6950
6960
6970
6980
6990
7000
7010
7020
7030
7040
7050
7060
7070
7080
7090
7100
7110
7120
7130
7140
7150
7160
7170
7180
7190
7200
7210
7220
7230
7240
7250
7260
7270
7280
7290
7300
7310
7320
7330
7340
7350
7360
7370
7380
7390
7400
7410
7420
7430
7440
7450
7460
7470
7480
7490
7500
7510
7520
7530
7540
7550
7560
7570
7580
7590
7600
7610
7620
7630
7640
7650
7660
7670
7680
7690
7700
7710
7720
7730
7740
7750
7760
7770
7780
7790
7800
7810
7820
7830
7840
7850
7860
7870
7880
7890
7900
7910
7920
7930
7940
7950
7960
7970
7980
7990
8000
8010
8020
8030
8040
8050
8060
8070
8080
8090
8100
81

ノ酸配列、

(iv) 上記(i)～(iii)の組合せにより変異されたアミノ酸配列
などが挙げられる。

【0014】

ここで、「キヌクリジノン還元酵素活性」とは、3-キヌクリジノンに特異的に作用し、3-キヌクリジノールを生成する触媒活性を意味する。当該酵素活性は、公知方法、例えば特許第4124453号に記載されたガスクロマトグラフィーによる活性測定法、分光光学法を用いた活性測定法により測定することができる。また、「キヌクリジノン還元酵素活性を有する」とは、配列番号2に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質のキヌクリジノン還元酵素活性を100としたときと比較して、10%以上、20%以上、30%以上、好ましくは90%以上の活性を有することを意味する。

10

【0015】

また、本発明のキヌクリジノン還元酵素には、配列番号2に示されるアミノ酸配列と約96%以上、好ましくは約97%以上、より好ましくは約98%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつキヌクリジノン還元酵素活性を有するもの(配列番号2に示されるアミノ酸配列と実質的に同等のアミノ酸配列)も含まれる。相同性は、インターネットを利用したホモロジー検索サイト、例えば日本DNAデータバンク(DDBJ)において、FASTA、BLAST、PSI-BLAST等の相同性検索を利用できる。また、National Center for Biotechnology Information (NCBI)において、BLASTを用いた検索を行うこともできる。

20

【0016】

ここで、配列番号2で示されるアミノ酸配列において1又は数個のアミノ酸に欠失、置換又は付加などの変異の生じたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press(1989))、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons(1987-1997))、Kunkel(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 488-92、Kramer and Fritz(1987)Method. Enzymol. 154: 350-67、Kunkel(1988)Method. Enzymol. 85: 2763-6等に記載の部位特異的変異誘発法等の方法に従って調製することができる。

【0017】

上記の変異を有するタンパク質を調製するためにポリヌクレオチドに変異を導入するには、Kunkel法やGapped duplex法等の部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット、例えばQuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit(ストラタジーン社製)、GeneTailor™ Site-Directed Mutagenesis System(インビトロジェン社製)、TaKaRa Site-Directed Mutagenesis System(Mutan-K、Mutan-Super Express Km等:タカラバイオ社製)等を用いて行うことができる。

30

【0018】

さらに、本発明のキヌクリジノン還元酵素には、他のペプチド配列により付加された融合タンパク質が含まれる。上記配列番号2に示すアミノ酸配列またはその変異体のアミノ酸配列に付加するペプチド配列としては、インフルエンザ凝集素(HA)、グルタチオンSトランスフェラーゼ(GST)、多重ヒスチジンタグ(6×His、10×His等)、FLAG等が挙げられ、これらのペプチド配列は、タンパク質の識別や採取を容易にするものであり、配列等は適宜選択することができる。

40

【0019】

また、本発明のキヌクリジノン還元酵素には、配列番号1で示される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるタンパク質であって、キヌクリジノン還元酵素活性を有するタンパク質も含まれる。

【0020】

このようなポリヌクレオチドは、上記部位特異的突然変異誘発法を利用して得ることができ、あるいは、配列番号1で示される塩基配列からなるポリヌクレオチド又はその断片をプローブとして、コロニーハイブリダイゼーション、ブランクハイブリダイゼーション

50

、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法によりcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーから得ることもできる。ライブラリーの作製方法については、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Press (1989))等を参照することができる。また、市販のcDNAライブラリー及びゲノムライブラリーを用いてもよい。

【0021】

「ストリンジェントな条件」は、BergerとKimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol.152, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1987)に教示されるように、複合体又はプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。例えば、ハイブリダイズ後の洗浄条件(いわゆるこれが「ストリンジェントな条件」)として、6xssc (1xsscの組成; 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0), 0.5% SDS, 5Xデンハート及び100 mg/ml ニシン精子DNA)を含む溶液にプローブと共に65℃で8~16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる(Sambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd ed.)。上記条件のほか、本発明においては、ハイブリダイゼーション後の洗浄条件として、例えば、「2×SSC、0.1% SDS、42℃」、「1×SSC、0.1% SDS、37℃」、よりストリンジェントな条件として、例えば、「1×SSC、0.1% SDS、65℃」、「0.5×SSC、0.1% SDS、50℃」等の条件を採用することもできる。

10

【0022】

ハイブリダイゼーションは、公知の方法によって行うことができる。ハイブリダイゼーションの方法は、例えば、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」(Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、「Current Protocols in Molecular Biology」(John Wiley & Sons (1987-1997))等を参照することができる。

20

【0023】

(2) 酵素の取得

本発明におけるキヌクリジノン還元酵素の供給源は、3-キヌクリジノン又はその塩に特異的に作用してR-3-キヌクリジノール又はその塩を生成する酵素が得られる限り、特に限定されるものではない。

【0024】

当該供給源としては、本発明に係る酵素を産生することができる微生物が挙げられる。このような微生物としては、Microbacterium属に属する微生物が好ましい。Microbacterium属に属する微生物としては、好ましいものとしてMicrobacterium estevoaromaticum (JCM9172)、Microbacterium arabinogalactanolyticum (JCM9171)、Microbacterium luteolum (JCM 9174)が挙げられる。特に好ましくはMicrobacterium luteolum JCM 9174である。なお、JCM番号が付された菌株は、独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンターから容易に入手することができる。

30

【0025】

本発明の酵素の単離精製方法は、蛋白質の溶解度による分画(有機溶媒による沈澱や硫酸などによる塩析など)、陽イオン交換、陰イオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィーなどのほか、キレート、色素又は抗体などを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜組み合わせることにより精製することができる。たとえば、菌体を破碎後、硫酸沈澱、Blue-Sepharose カラム、DEAT-Toyopearl、HiLoad Superdex 200 pg FPLC カラム、HAP-C-BEADA hydroxyapatite FPLC カラム、Pros HQ/M FPLC カラム、BioAssistQ FPLCカラムクロマトグラフィー等を行うことにより、ほぼ単一バンド(ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE))にまで精製することができる。また、このような微生物以外にも、遺伝子工学的手法により当該酵素を産生することが可能となった形質転換微生物(後述)を使用することができる。

40

【0026】

(3) キヌクリジノン還元酵素遺伝子

本発明はまた、上記キヌクリジノン還元酵素の遺伝子を提供する。なお、ここでいう遺

50

伝子には、ゲノムDNA、cDNA、合成DNAならびにRNAが含まれる。

【0027】

当該遺伝子は、前述するアルコール脱水素（タンパク質）をコードする塩基配列を有するものであればよい。具体的には、配列番号1に示す塩基配列からなるDNA、並びにそのホモログを挙げることができる。ここでホモログとしては、配列番号1で示される塩基配列からなるDNAによってコードされるタンパク質（キヌクリジノン還元酵素）と機能的に同等なタンパク質をコードする遺伝子を挙げることができる。

「機能的に同等」とは、配列番号1で示されるアミノ酸配列からなるタンパク質（アルコール脱水素）と同様に、好ましくはpHが約6.0～8.0の範囲、より好ましくはpHが約6.5～7.5の範囲でキヌクリジノン還元酵素活性を有することを意味する。

10

【0028】

本発明において、ホモログとしては、上記(1)において説明した酵素の性質の(イ)～(ホ)の少なくとも1つの性質又は特徴を有するタンパク質をコードするポリヌクレオチドを挙げることができる。かかるホモログとして、具体的には、配列番号1で示される塩基配列に対して相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチド(例えばDNA)とストリンジントな条件でハイブリダイズする塩基配列を有する遺伝子を挙げることができる。

【0029】

「ストリンジントな条件」は前記した条件と同様であり、BergerとKimmel (Guide to Molecular Cloning Techniques Methods in Enzymology, Vol.152, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1987)に教示されるように、複合体又はプローブを結合する核酸の融解温度(T_m)に基づいて決定することができる。

20

【0030】

例えば、ハイブリダイズ後の洗浄条件(いわゆるこれが「ストリンジントな条件」として、6xssc (1xsscの組成; 0.15 M NaCl, 0.015 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0), 0.5% SDS, 5Xデンハート及び100 mg/ml ニシン精子DNA)を含む溶液にプロ-ブと共に65℃で8～16時間恒温し、ハイブリダイズさせる条件が挙げられる(Sambrookら、Molecular Cloning-A Laboratory Manual, 2nd ed.)。

【0031】

本明細書において、ストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドには、例えば、配列番号1で示される塩基配列と少なくとも80%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは96%以上、さらに好ましくは98%以上の同一性(相同性)を有する塩基配列を含むポリヌクレオチドが含まれる。同一性を示す値は、BLASTなどの公知のプログラムを利用することにより算出することができる。

30

【0032】

また、配列番号1で示される塩基配列に相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドは、例えば、配列番号1で示される塩基配列において1個又は数個の核酸に欠失、置換又は付加などの変異の生じた塩基配列を含むポリヌクレオチドが挙げられる。

【0033】

ここで、配列番号1で示される塩基配列において1個又は数個の核酸に欠失、置換又は付加などの変異の生じた塩基配列としては、例えば、

40

(a) 配列番号1で示される塩基配列中の1～10個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)の核酸が欠失した塩基配列、

(b) 配列番号1で示される塩基配列中の1～10個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)の核酸が他の核酸で置換された塩基配列、

(c) 配列番号1で示される塩基配列に1～10個(例えば、1～5個、好ましくは1～3個、より好ましくは1～2個、さらに好ましくは1個)の核酸が付加した塩基配列、

(d) 上記(a)～(c)の組合せにより変異された塩基配列などが挙げられる。

50

【 0 0 3 4 】

本酵素遺伝子の単離方法は、精製した酵素のN末端アミノ酸配列や内部ペプチドのアミノ酸配列や特定の機能を持つ酵素は、比較的類似したアミノ酸配列を有することなどを利用して縮重プライマーを設計し、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により、特定の遺伝子部分配列を増幅することにより取得することができる。

【 0 0 3 5 】

たとえば、キヌクリジノン還元酵素の1種であるトロピノン還元酵素遺伝子類で保存されているアミノ酸配列などを比較してプライマー又はプローブを設計し、PCR法により、あるいはコロニーハイブリダイゼーション法、ブランクハイブリダイゼーション、サザンブロット等の公知のハイブリダイゼーション法によりcDNAライブラリー、ゲノムライブラリーなどの核酸から得ることができる。ライブラリーの作製方法は、「Molecular Cloning, A Laboratory Manual 2nd ed.」（Cold Spring Harbor Press（1989））を参照することができる。この際、プライマーには、適当な制限酵素配列やタグ配列等を付加させてもよい。

10

【 0 0 3 6 】

ここで、公知の酵素の保存領域を参照して作製されたプライマー等を利用して遺伝子を取得する場合、一般には、比較した酵素と性質の似た酵素遺伝子が得られるはずである。しかしながら、本発明の酵素は、従来知られていた酵素とは全く性質の異なる酵素であり、本発明によって意外にもこのような酵素をコードする遺伝子が得られたことは、当業者が予測し得るものではないといえる。

20

【 0 0 3 7 】

さらに、本発明のキヌクリジノン還元酵素は、本発明で開示するアミノ酸配列に基づいてPCR法等の化学的または遺伝子工学的的手法によって製造することができる。遺伝子工学的的手法による本発明の酵素の製造方法の詳細については、後述する。また、アミノ酸配列における改変は、当業界において既に公知な方法、例えば部位特異的変異導入法[Current Protocols I molecular Biology, edit. Ausubel et al., John Wiley & Sons, Section 8. 1-8.5 (1987)]等を用いて、改変しようとするアミノ酸配列に、適宜、置換、欠失、挿入、付加、逆位などの変異を導入することによって行うことができる。

【 0 0 3 8 】

ストリンジェントな条件としては、前述のものを同様に挙げることができる。具体的なホモログとしては、配列番号3で示される塩基配列を有する遺伝子（当該遺伝子によりコードされるタンパク質のアミノ酸配列：配列番号4）を挙げることができる。

30

【 0 0 3 9 】

本発明において、塩基配列の確認は、慣用の方法により配列決定することにより行うことができ、例えば、適当なDNAシーケンサーを利用して配列が解析される。一旦本発明の遺伝子の塩基配列が決定されると、その後は、当該塩基配列情報に基づき、PCR法により、あるいは他の化学的な合成法によって本発明の遺伝子を調製することができる。

【 0 0 4 0 】

（ 4 ） 組 み 換 え ベ ク タ ー

本発明は、上記キヌクリジノン還元酵素をコードする遺伝子を含有する組み換えベクターを提供する。当該組み換えベクターは、上記キヌクリジノン還元酵素をコードする遺伝子を、所望の宿主細胞内で発現可能な状態で含んでおり、当該宿主細胞を形質転換するために使用される。

40

【 0 0 4 1 】

したがって、本発明の組み換えベクターは、宿主細胞の形質転換が達成できる形態を有するものであればよく、例えばプラスミド、バクテリオファージ、レトロトランスポソンの形態を有するものであってもよい。

【 0 0 4 2 】

本発明の組み換えベクター（発現ベクター）は、宿主として大腸菌（*E. coli*）や枯草菌

50

(*B. subtilis*)などの細菌を使用する場合、一般に、少なくともプロモーター - オペレーター領域 (プロモーター、オペレーター及びリボゾーム結合領域 (SD領域)を含む)、開始コドン、本発明のキヌクリジノン還元酵素遺伝子、終止コドン、ターミネーター領域、及び複製可能単位を有する。

【0043】

また、酵母等の真菌細胞または動物細胞を宿主細胞として用いる場合は、一般に、少なくともプロモーター、開始コドン、シグナルペプチド及び本発明のキヌクリジノン還元酵素遺伝子、及び終止コドンを含む。

【0044】

また、本発明の組み換えベクター (発現ベクター) は、必要に応じて、エンハンサーなどのシスエレメント、本発明のキヌクリジノン還元酵素遺伝子の5'側または3'側の非翻訳領域、スプライシング接合部、ポリアデニレーション部位、複製可能単位、相同領域、選択マーカーを含むことができる。これらのエレメントは、本発明のキヌクリジノン還元酵素遺伝子の発現に用いられる宿主に対応したものであれば、特に制限されず、当分野の技術常識に基づいて選択することができる。

【0045】

なお、選択マーカーとしては、特に制限されず、例えば遺伝子発現に使用される宿主が細菌の場合は、薬剤抵抗性遺伝子 (例えば、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、シクロヘキシミド耐性遺伝子、テトラマイシン耐性遺伝子など)、宿主が細菌以外の例えば酵母などの場合は、栄養要求性遺伝子 (例えば、HIS4、URA3、LEU2、ARG4など)などを始めとする公知の各種選択マーカーを利用することができる。

【0046】

本発明の組換えベクター (発現ベクター) は、簡便には、上記本発明のキヌクリジノン還元酵素遺伝子を、公知の発現用ベクターに、目的のキヌクリジノン還元酵素が発現可能な状態で導入することによって、具体的にはプロモーターの下流に導入することによって作製することができる。かかる導入は、DNA組換えの一般的な方法、例えばMolecular Cloning. (1989). (Cold Spring Harbor Lab.)に記載される方法に従って行うことができる。

【0047】

発現用ベクターに用いるプラスミドベクターとして、例えばpRS413、pRS415、pRS416、YCp50、pAUR112またはpAUR123などのYCp型大腸菌 (*E. coli*) - 酵母シャトルベクター; pRS403、pRS404、pRS405、pRS406、pAUR101またはpAUR135などのYIp型大腸菌 (*E. coli*) - 酵母シャトルベクター; 大腸菌 (*E. coli*) 由来のプラスミド (例えばpBR322、pBR325、pUC18、pUC19、pUC119、pTV118N、pTV119N、pBluescript、pHSG298、pHSG396またはpTrc99AなどのColE系プラスミド; pACYC177またはpACYC184などのp1A系プラスミド; pMW118、pMW119、pMW218またはpMW219などのpSC101系プラスミドなど); 枯草菌 (*B. subtilis*) 由来のプラスミド (例えばpUB110、pTP5など); pHSP64などの大腸菌 (*E. coli*) - 枯草菌 (*B. subtilis*) シャトルベクターを挙げることができる。

【0048】

またファージベクターとして、λファージ (Charon 4A, Charon21A, EMBL4, λgt100, gt11, zap)、ψX174、M13mp18、M13mp19などを挙げることができる。レトロトランスポゾンとしてはTy因子などを挙げることができる。また、融合タンパク質として発現する発現ベクター、例えばpGEXシリーズ (ファルマシア製)、pMALシリーズ (Biolabs社製)を使用することもできる。

【0049】

(5) 形質転換体

以下、より詳細に形質転換 (導入) 体 (以下、単に「形質転換体」と称す) の作製方法について説明する。

形質転換体を作製するための発現ベクターは、宿主細胞中にてプラスミドが増殖するために必要なDNA配列、プロモーター、リボゾーム結合配列、転写終結配列、更に好まし

10

20

30

40

50

くは形質転換体の選択マーカーとなる遺伝子を含む。

【0050】

プロモーター配列としては、大腸菌由来のトリプトファンオペロンの *trp* プロモーター、ラクトースオペロンの *lac* プロモーター、ラムダファージ由来の *P_L* プロモーターおよび *P_R* プロモーターなどが挙げられる。また、枯草菌由来のグルコン酸合成酵素プロモーター (*gnt*)、アルカリプロテアーゼプロモーター (*apr*)、中性プロテアーゼプロモーター (*npr*)、 α -アミラーゼプロモーター (*amy*) 等を挙げることができる。さらに、*tac* プロモーター、*trc* プロモーター等の独自に改変及び設計された配列も利用できる。

【0051】

リボソーム結合配列としては、*SD* 配列や *Kozak* 配列が知られており、これらの配列を変異遺伝子上流に挿入することができる。原核生物を宿主に用いるときには *SD* 配列を、真核細胞を宿主に用いるときには *Kozak* 配列を *PCR* 法等により付加してもよい。*SD* 配列としては、大腸菌由来、ロドコッカス 属細菌または枯草菌由来の配列等を挙げることができるが、所望の宿主内で機能する配列であれば特に限定されるものではない。例えば、16S リボソーム RNA の 3' 末端領域に相補的な配列が4塩基以上連続したコンセンサス配列を DNA 合成により作製してこれを利用してもよい。

転写終結配列は発現ベクターの構築には必ずしも必要ではないが、 ρ 因子非依存性のもの、例えばリボプロテインターミネーター、*trp* オペロンターミネーター等が利用できる。

選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、カナマイシン耐性遺伝子等を挙げることができる。

宿主としては、上記の酵素遺伝子が発現するものであれば良い。例えば、哺乳動物細胞、昆虫細胞、大腸菌、枯草菌、酵母、カビ、植物等を挙げることができる。好ましくは、大腸菌及びロドコッカス 属細菌である。

大腸菌宿主としては、例えば大腸菌 K12 株や B 株、あるいはそれら野生株由来の派生株である JM109 株、XL1-Blue 株、C600 株、W3110 株等を挙げることができる。その他、これら菌株の変異体、組換え体および遺伝子工学的的手法による誘導体等も用いられ得る。

【0052】

ロドコッカス 属細菌としては、例えばロドコッカス ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) ATCC 12674 株やロドコッカス ロドクロウス (*Rhodococcus rhodochrous*) J-1 株 (FERM BP-1478) 等を挙げることができる。

大腸菌を宿主に用いる場合には、特に有用なベクターとしては、*pTrc99A*、*pKK233-2*、*pFY529*、*pET-12*、*pET-26b* 等が例示される。これらベクターに本発明のキヌクリジノン還元酵素遺伝子又はその断片を組み込むには、これらを含む DNA を適当な制限酵素で切断し、必要であれば適当なリンカ-を付加した後、適当な制限酵素で切断したベクターと結合させることにより行うことができる。

このようにして得られた発現ベクターを宿主細胞に導入すれば、本発明のキヌクリジノン還元酵素を高発現する形質転換体を得られる。そして、当該形質転換体を培養することにより、これらの酵素を発現・蓄積させることができる。

【0053】

発現ベクターの宿主への導入方法としては、DNA を導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等を挙げることができる。酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロミセス・ボンベ (*Schizosaccharomyces pombe*)、ピヒア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等を用いることができる。酵母への発現プラスミドの導入方法としては、酵母に DNA を導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。

【0054】

10

20

30

40

50

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、CHO細胞、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0055】

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞等が用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が用いられる。

【0056】

植物細胞を宿主とする場合は、タバコBY-2細胞等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。植物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばアグロバクテリウム法、パーティクルガン法、PEG法、エレクトロポレーション法等が用いられる。

【0057】

(6) キヌクリジノン還元酵素の製造

このようにして得られた形質転換体は、宿主に応じて適切な培地中で培養されることによって、本発明の新規キヌクリジノン還元酵素を産生することができる。本発明は、かかる形質転換体を利用した新規キヌクリジノン還元酵素の製造方法を提供するものである。当該方法は、具体的には、上記の形質転換体を培地で培養し、得られた培養物から、キヌクリジノン還元酵素を採取することによって実施することができる。

【0058】

本発明において、「培養物」とは、培養上清、培養細胞、培養菌体、又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

【0059】

培地には、上記形質転換体の生育に必須な炭素源、窒素源、無機塩、ビタミン、薬剤などが含有される。炭素源としてはマンナン成分、アラビノース、セロビオース、フルクトース、ガラクトース、グルコース、グリセロール、イノシトール、ラクトース、マンニトール、マンノース、ラフィノース、ラムノース、スクロース、トレハロース、キシロースが；窒素源としては硫酸アンモニウムや塩化アンモニウムなどの無機窒素、並びにカゼイン分解物、酵母抽出物、ポリペプトン、バクトトリプトン及びビーフ抽出物などの有機窒素源；無機塩としては例えば二リン酸ナトリウムまたは二リン酸カリウム、リン酸水素ナトリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化カルシウム等；ビタミンとしてはビタミンB1を始めとする各種のビタミン；薬剤としてはアンピシリン、ネオマイシン、シクロヘキシミド、テトラマイシンなどの各種抗生物質を挙げることができる。なお、これらは一例であり、これらに制限はされない。

【0060】

培地の一例としては、宿主が大腸菌などのグラム陰性菌、または枯草菌などのグラム陽性菌といった細菌の場合は、LB培地（日水製薬）、M9培地（J. Exp. Mol. Genet., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p.431, 1972）などが；また宿主が酵母の場合、YPD培地（1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glycerol）、YPG培地（1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glycerol）、YP培地（1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone）、YPD培地（1% Bacto yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% glucose）、0.7% Yeast Nitrogen Base（Difco社）、YP培地〔1% Bacto yeast extract（Difco社）、2% Polypeptone S（日本製薬）〕、などが例示される。

【0061】

培養は、通常10～40℃の温度範囲で数～80時間程度実施され、必要に応じて通気、攪拌を加えることもできる。培養温度は、宿主に応じて設定できるため、特に制限されないが、好ましくは18～42℃、より好ましくは25～38℃の範囲で実施することができる。

【0062】

10

20

30

40

50

本発明のキヌクリジノン還元酵素の製造方法は、さらに、このようにして得られる培養物から目的のキヌクリジノン還元酵素を採取することによって実施される。目的タンパク質の採取は、培養後、培養上清中または形質転換体（菌体）中に蓄積された、目的のタンパク質を公知の方法で抽出し、また必要に応じて精製することによって行うことができる。

【0063】

本発明の酵素の単離精製方法は、蛋白質の溶解度による分画（有機溶媒による沈澱や硫酸などによる塩析など）や陽イオン交換、陰イオン交換、ゲルろ過、疎水性クロマトグラフィーや、キレート、色素、抗体などを用いたアフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適当に組み合わせることにより精製することができる。

10

【0064】

たとえば、菌体を破碎後、硫酸沈澱、Blue-Sepharose カラム、DEAT-Toyopearl、Hilo ad Superdex 200pg FPLC カラム、HAP-C-BEADA hydroxyapatiteFPLC カラム、Pros HQ/M FPLC カラム、BioAssistQ FPLCカラムクロマトグラフィー等を行うことによりポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）的にほぼ単一バンドにまで精製することができる。

【0065】

また、本発明においては、上記キヌクリジノン還元酵素遺伝子又は上記ベクターから無細胞タンパク質合成系を採用して、キヌクリジノン還元酵素を産生することが可能である。

20

【0066】

無細胞タンパク質合成系とは、細胞抽出液を用いて試験管などの人工容器内でタンパク質を合成する系である。なお、本発明において使用される無細胞タンパク質合成系には、DNAを鋳型としてRNAを合成する無細胞転写系も含まれる。

【0067】

上記細胞抽出液は、真核細胞由来又は原核細胞由来の抽出液、例えば、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球、マウスL-細胞、HeLa細胞、CHO細胞、出芽酵母、大腸菌などの抽出液を使用することができる。なお、これらの細胞抽出液は濃縮されたものであっても濃縮されないものであってもよい。細胞抽出液は、例えば限外濾過、透析、ポリエチレングリコール(PEG)沈殿等によって得ることができる。

30

【0068】

さらに本発明において、無細胞タンパク質合成は、市販のキットを用いて行うこともできる。そのようなキットとしては、例えば試薬キットPROTEIOSTM（東洋紡）、TNTTM System（プロメガ）、合成装置のPG-MateTM（東洋紡）、RTS（ロシュ・ダイアグノスティクス）などが挙げられる。

【0069】

上記のように細胞タンパク質合成によって得られるキヌクリジノン還元酵素は、前述のように適宜クロマトグラフィー等を選択して、精製することができる。

【0070】

（7）光学活性3-キヌクリジノールの生成

本発明において、3-キヌクリジノンの塩又は3-キヌクリジノールの塩とは、当該化合物中に存在する窒素原子を、有機酸又は鉱酸等により塩を形成させたものを意味する。

【0071】

鉱酸塩としては、塩酸塩、臭化水素酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩等が例示できる。有機酸塩としては酢酸塩、プロピオン酸塩、酪酸塩、フマル酸、マロン酸、シュウ酸等の脂肪族有機酸塩、安息香酸等の芳香族有機酸塩等が例示される。

【0072】

本発明において、酵素とは、精製酵素に限定されず、当該酵素を含む微生物、粗精製物、固定化物等も含まれる。また、本発明において、形質転換微生物とは本発明の酵素をコードする遺伝子が導入され、該遺伝子が発現した組換え微生物をいう。その宿主としては

50

、例えば、エシェリキア (Escherichia) 属、バチルス (Bacillus) 属、シュードモナス (Pseudomonas) 属、ピキア (Pichia) 属、カンジダ (Candida) 属、アスペルギルス (Aspergillus) 属などが挙げられる。

【0073】

さらに、形質転換微生物の「処理物」とは、アセトン乾燥微生物菌体、凍結乾燥微生物菌体、機械的並びに酵素的方法により細胞壁を破碎した無細胞抽出物、界面活性剤、有機溶媒などにより処理したものあるいはそれらの固定化物などをいう。

【0074】

本発明において、不斉還元反応による R - 3 - キヌクリジノール又はその塩の生産は、以下の方法で行うことができる。グルコース、ギ酸、イソプロパノール、エタノール、メタノール等のエネルギー源の存在下、水または緩衝液等の反応溶媒中で 3 - キヌクリジノン又はその塩に酵素、形質転換微生物、または該菌体処理物を接触させることにより行うことができる。このとき、必要に応じて補酵素 (NADH、NADPH、NAD⁺、NADP⁺) を添加すればよい。本発明においては NADH を添加することが好ましい。

10

【0075】

当該反応は一バッチで行っても良いし、反応基質 (3 - キヌクリジノン又はその塩)、補酵素、エネルギー源等を適宜加え、反応を継続させることも可能である。継続して反応を行う場合には、反応液の pH を制御しながら反応を行えばよい。

【0076】

また、還元反応に付随して NADH から生成する NAD⁺ の、NADH への再生は、微生物の持つ NAD⁺ 還元能 (解糖系など) を用いて行うことができる場合がある。これら NAD⁺ 還元能は、反応系にグルコースやエタノールを添加することにより増強することが可能である。また、NAD⁺ から NADH を生成する能力を有する微生物やその処理物、酵素を反応系に添加することによっても行うことができる。

20

【0077】

反応液中の基質濃度は特に限定されるものではないが、例えば、0.01 ~ 50 重量 % が好ましく、生産性等の面からも 0.05 ~ 30 重量 % の濃度で実施するのが好ましい。反応液中の酵素等の触媒の濃度は、その形状及びその活性により適宜決定され、特に限定されない。反応温度は 0 ~ 60 が好ましく、5 ~ 50 がより好ましい。

【0078】

反応液の pH は用いる酵素の至適 pH 等を考慮して、特に限定されず、総合的に決定される。pH 5 ~ 10 程度の範囲でも反応を行うことが可能であるが、本酵素の至適 pH 6.0 から 8.0 の範囲で実施することがより好ましい。また、反応が進行するに従い pH が変化してくるが、この場合は適当な中和剤を添加して最適 pH に調整することができる。

30

【0079】

反応溶媒は、通常はイオン交換水、緩衝液等の水性媒体を使用するが、3 - キヌクリジノン又はその塩の溶解を促進させるために、有機溶媒又は界面活性剤を含んだ系でも反応を行うことができる。

【0080】

有機溶媒としては、例えば、メタノール、エタノール、プロパノール、イソプロパノール、ブタノール、イソブタノール、t-ブチルアルコール、t-アミルアルコール等のアルコール系溶媒、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン等の脂肪族炭化水素系溶媒、ベンゼン、トルエン、キシレン等の芳香族炭化水素系溶媒、塩化メチレン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン等のハロゲン化炭化水素系溶媒、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、ジオキサン等のエーテル系溶媒、酢酸エチル、酢酸プロピル、酢酸ブチル等のエステル系溶媒、アセトン、メチルエチルケトン、メチルイソブチルケトン等のケトン系溶媒、その他アセトニトリル、N,N-ジメチルホルムアミド等の一種又は複数を適宜選択して使用することができる。

40

【0081】

また、これらの有機溶媒又は界面活性剤を水への溶解度以上に加えて 2 層系で反応を行

50

うことも可能である。有機溶媒を反応系に共存させることで、選択率、変換率、収率などを向上させることも可能である。

反応時間は、目的とする化合物の量や酵素活性の続く時間等を考慮して、当業者であれば適宜選択することができるが、通常、1時間～1週間程度、好ましくは1～72時間程度が好ましい。

【0082】

反応終了混合液からの目的物の単離は、除菌後、濃縮、抽出、カラム分離、結晶化等通常の公知の方法によって行うことができる。例えば、pHをアルカリ性に調整後、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル等のエーテル類；酢酸エチル等のエステル類；ヘキサン、ベンゼン、トルエン等の炭化水素類；塩化メチレン等のハロゲン化炭化水素類；ブタノール、イソブタノール、t-アミルアルコール等のアルコール系溶媒等一般的な溶媒により抽出分離することができる。

10

【0083】

目的物が光学活性3-キヌクリジノールであることの確認は、ガスクロマトグラフィーあるいは、高速液体クロマトグラフィーにより、標品と溶出時間を比較することにより行われる。

【0084】

以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例の範囲に限定されるものではない。

【実施例1】

20

【0085】

Microbacterium luteolumのキヌクリジノン還元酵素遺伝子の取得

キヌクリジノンを(R)-キヌクリジノールに還元する公知の酵素(トロピノン還元酵素I及びII: Hashimoto et al. Plant Physiol. (1992) 100, 836-845)のアミノ酸配列を参考にして保存領域を推定し、アミノ酸配列を塩基配列に変換した縮重プライマーを設計した。

【0086】

Microbacterium luteolum JCM 9174株のゲノムDNAをMicrobial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, Inc.)を用いて抽出した。この抽出したゲノムDNAを鋳型として、以下の塩基配列を持つ縮重プライマー(FW1及びRV1)を用いて、KOD-Plus-Ver.2(東洋紡社)及びThermalCyclerを用いて、PCR反応を行った。

30

【0087】

FW: 5' -ACNGCNYTNGTBACNGGYGGY-3' (配列番号5)

RV: 5' -NCCNGTNAYRTARCTNGCNGCNGG-3' (配列番号6)

PCR反応液組成:

ゲノムDNA	2 µl
プライマー FW 1 (100 µM)	1.5 µl
プライマー RV 1 (100 µM)	1.5 µl
×10 buffer for KOD-plus- ver.2	5 µl
2 mM dNTP mix	5 µl
25 mM MgSO ₄	3 µl
KOD-plus- (DNAポリメラーゼ)	1 µl
蒸留水	31 µl

40

反応は、94 で2分間の加熱処理を行った後、98 で10秒間の変性、37 で30秒間のアニーリング、68 で1分間の伸長反応のサイクルを30サイクル行い、その後68 で2分間処理した。精製はWizard(R) SV Gel and PCR Clean-Up System(プロメガ)を用いて行った。

その結果、特異的な約700bpの増幅断片を得た。

50

得られた増幅断片の塩基配列を決定し、さらに、DNA Walking SppedUp Premix Kit (Se egene社)を用いて、ゲノムDNA上の取得配列両側の未知配列を決定し、Microbacterium luteolumのキヌクリジノン還元酵素遺伝子の全配列を決定した(配列番号2)。

【実施例2】

【0088】

Microbacterium luteolumのキヌクリジノン還元酵素遺伝子の発現ベクターの構築

実施例1にて調製したMicrobacterium luteolum JCM 9174株のゲノムDNAを鋳型として、及び以下のプライマー(FW2及びRV2)を用いてPCRを行った。

【0089】

FW2:5'-ATGATCATGAACCTCACCGA-3' (配列番号7)

10

RV2:5'-CTATTGTGCGGTGTATCCTC-3' (配列番号8)

PCR反応液組成:

ゲノムDNA	2 µl
プライマー FW 2 (100 µM)	1.5 µl
プライマー RV 2 (100 µM)	1.5 µl
×10 buffer for KOD-plus- ver.2	5 µl
2 mM dNTP mix	5 µl
25 mM MgSO ₄	3 µl
KOD-plus- (DNAポリメラーゼ)	1 µl
蒸留水	31 µl

20

PCR反応は、KOD -Plus- Ver.2 (東洋紡社) 及びThermalCyclerを用いて行い(サイクル条件: 94 で2分間の加熱処理を行った後、98 で10秒間の変性、37 で30秒間のアニーリング、68 で1分間の伸長反応のサイクルを30サイクル)、得られた特異的な約770bpの増幅断片を得た。得られた増幅断片をpCR (登録商標) 2.1-TOPO (登録商標) (promega) にTAクローニングし、TA-BACを作製した。

【0090】

このTA-BACを制限酵素EcoRI及びHindIIIで処理後、BAC遺伝子をpET28-a(+) (Novagen社) の制限酵素EcoRI及びHindIIIサイトにサブクローニングし、pET28a-BACを作製した。

30

【実施例3】

【0091】

3-キヌクリジノン還元活性の測定

pET28a-BACを宿主であるE. coli BL21(DE3)株に形質転換し、得られた遺伝子組換え体E. coli BL21(DE3)株/pET28a-BACを、4mlのMagic Media (登録商標) E. coli Expression Medium(invitrogen)にカナマイシン(終濃度50 µg/ml)を添加した培地に加え、37で14時間振とう培養した。培養後、集菌して緩衝液に再懸濁し、超音波破碎した。破碎液を遠心し(10,000 rpm×10分)、その上清を粗酵素とした。さらにNi-NTA resin(Qiagen)を用いて部分精製酵素を調製し、3-キヌクリジノン変換反応について調べた。

【0092】

40

10 mM 3-キヌクリジノン、0.3 µM NADH及び0.2 Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)を含む1 mlの反応液を、粗酵素を添加前する前に25 で約5分間予備加温した。加温後、反応液に粗酵素液を加えて速やかに混和後、水を対照に25 に制御された分光光度計を用いて波長340 nmの吸光度変化を2分~3分間記録し、その初期直線部分より1分間あたりの吸光度変化を求めた。波長340 nmにおけるNADHの分子吸光係数を6.22 mM⁻¹ cm⁻¹で、1分間に1 µmolのNADHが減少する酵素量を1単位(U)とし、活性値を求めた。

その結果、培養液1 mlあたりに換算して0.23 Uの酵素活性を示した。

【実施例4】

【0093】

分子量の測定

50

実施例 3 記載の方法で作製した部分精製酵素画分中のキヌクリジノン還元酵素の分子量およびポリアクリルアミドゲル電気泳動の分子量は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を用い、以下の条件で検討した。

【 0 0 9 4 】

カラムにTSK-GEL G3000SW×X（東ソー株式会社）、溶離液に0.1M NaClを含む0.1M リン酸緩衝液(pH7.0)を使用し、流速1.0ml/minでゲル濾過クロマトグラフィーを行った。

【 0 0 9 5 】

溶出液を分別回収し、各画分における3-キヌクリジノン還元酵素活性の測定結果により3-キヌクリジノン還元酵素の溶出時間（19.975min）を求め、分子量マーカー(MW-Marker；オリエンタル酵母工業株式会社)の溶出時間（表 1）と比較して画分中のタンパク質の分子量を求めた。

10

SDS-PAGEは12.5% (w/v)ポリアクリルアミドゲルを使用した。タンパク質の検出はクマジーブリリアントブルーR-250を用いて行った。

この結果から、本発明の酵素の分子量は約71,800（ゲル濾過）であることが示された。また、SDS-PAGEの結果より、本発明の酵素は、サブユニットが分子量が31,000の2量体であると推定された。

【 0 0 9 6 】

【表 1】

マーカータンパク質のゲル濾過クロマトグラフィー

20

Da	溶出時間 (min)
290,000	16.427
142,000	18.600
67,000	20.548
32,000	22.115
12,400	24.578

【実施例 5】

30

【 0 0 9 7 】

至適 pH の測定

本実施例では、実施例 3 記載の方法で作製した部分精製酵素を用いて反応pH依存性を調べた。方法は、pH5.0～8.5の緩衝液を用いた以外は全て実施例 3 に記載した方法を行った。

結果を図 2 に示す。図 2 の結果より、本酵素の至適 pH は、6.5～7.5であることが示された。

【実施例 6】

【 0 0 9 8 】

基質特異性の測定

本実施例では、実施例 3 記載の方法で作製した部分精製酵素を用いて、表 2 に記載のケトン類を基質として反応特異性を調べた。反応条件は、基質以外は、実施例 3 記載の方法で実施した。

40

その結果、本発明の酵素は3-キヌクリジノンと特異的に反応し、3-キヌクリジノン以外の基質には全く反応しなかった（表 2）。

【 0 0 9 9 】

【表 2】

表 2. 基質特異性

	基質濃度	比活性(U/ml)
3-Quinuclidinone	10mM	0.23
Tropinone	10mM	ND
6-Hydroxytropinone	10mM	ND
N-Methyl-4-piperidone	10mM	ND
4-Piperidone	10mM	ND
Tetrahydrothiopyran-4-one	10mM	ND
4-Methylcyclohexanone	10mM	ND
3-Methylcyclohexanone	10mM	ND
2-Methylcyclohexanone	10mM	ND

表 2 において、「ND」は検出限界以下を示す。

【実施例 7】

【0100】

NADH再生系酵素を共存させた(R)-キヌクリジノールの生産反応

本実施例では、実施例 3 記載の方法で作製した部分精製酵素を用いて、3-キヌクリジノンから(R)-キヌクリジノールへの変換反応について調べた。

【0101】

0.5mM NADH、0.12M 3-キヌクリジノン、0.2Mリン酸カリウム緩衝液(pH7.0)、0.24Mギ酸、0.4U ギ酸脱水素酵素及び部分精製酵素からなる反応液を30、120rpm、5時間以上変換反応させた。反応後、上記反応液0.8mlに、6N NaOHを0.16ml及び5mMオクタノールを溶かしたブタノール0.96mlを添加してよく攪拌し、5000rpmで5分間遠心した。上層のブタノール層を新しいチューブに取り、硫酸ナトリウムを加え脱水、15000rpmで1分間遠心をおこない、上澄み液をキヌクリジノールの分析サンプルとした。キヌクリジノールの分析にはガスクロマトグラフを用いた。

【0102】

(ガスクロマトグラフによるキヌクリジノールの分析方法)

3-キヌクリジノールの定量にはガスクロマトグラフGC-18A(島津製作所)を用いた。分析条件は以下の通りで行った。

【0103】

カラム : Rtx-5 Amine (30m×0.25µm)

カラム温度 : 70 -180 (昇温速度10 /min)

インジェクション温度 : 250

検出温度 : 250

スプリット比 1対40

内部標準溶液 : 1-ブタノールに5mMオクタノールを溶かしたもの

【0104】

(ガスクロマトグラフによる(R)-キヌクリジノールの分析方法)

(R)-キヌクリジノールの定量にはガスクロマトグラフHP6890シリーズGC system(Hewlett-Packard)を用いた。分析条件は以下の通りで行った。

【0105】

カラム : cyclodextrine(25m×0.25µm)

カラム温度 : 70 -180 (昇温速度8 /min)

インジェクション温度 : 250

検出温度 : 250

スプリット比 1対50

内部標準溶液 : 1-ブタノールに5mMオクタノールを溶かしたもの

それぞれ内部標準(オクタノール)を元にエリア値を補正して、作成した検量線に従いキヌクリジノールの生成量を算出した。

その結果、生成したキヌクリジノールは、(R)体(99%ee以上)であることが確認された。

【図面の簡単な説明】

【0106】

10

【図1】ゲル濾過クロマトグラフィーの結果を示す図である。

【図2】本発明の酵素の至適pHの測定結果を示す図である。

【配列表フリーテキスト】

【0107】

配列番号5 : 合成DNA

配列番号5 : nは、a、c、g又はtを表す(存在位置 : 3、6、9、15)

配列番号6 : 合成DNA

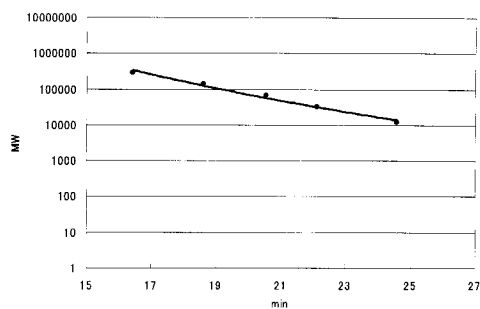
配列番号6 : nは、a、c、g又はtを表す(存在位置 : 1、4、7、16、19、22)

配列番号7 : 合成DNA

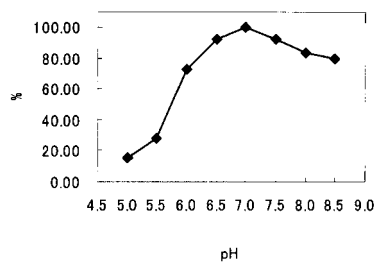
配列番号8 : 合成DNA

20

【図1】



【図2】



【配列表】

2010051207000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 P	17/12	(2006.01)	C 1 2 P	17/12	

(72)発明者 伊藤 伸哉

富山県射水市黒河 5 1 8 0 富山県立大学内

F ターム(参考) 4B024 AA03 BA08 CA02 DA06 GA11
4B050 CC01 CC03 DD02 EE10 LL05
4B064 AE49 CA19 CA21 CB18 CC24 CD12 DA01
4B065 AA01Y AA26X AB01 BA02 CA28 CA44