

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4430757号  
(P4430757)

(45) 発行日 平成22年3月10日(2010.3.10)

(24) 登録日 平成21年12月25日(2009.12.25)

(51) Int. Cl.	F 1	
<b>C 1 2 N 15/09</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A
<b>C 1 2 P 21/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 21/00 C
<b>C 1 2 P 13/00</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 P 13/00
<b>C 1 2 N 9/88</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 9/88
<b>C 1 2 R 1/91</b>	<b>(2006.01)</b>	C 1 2 N 9/88

請求項の数 8 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平11-188094	(73) 特許権者	599065370
(22) 出願日	平成11年7月1日(1999.7.1)		デーエスエム・ファイン・ケミカルズ・オーストリア・ナッフホルゲル・ゲゼルシヤフト・ミト・ベシユレンクテル・ハフツング・ウント・コンパニー・コマンデイト
(65) 公開番号	特開2000-125886(P2000-125886A)		ゲゼルシヤフト
(43) 公開日	平成12年5月9日(2000.5.9)		オーストリア国、4021リンツ、ザンクト・ペーター・ストラーセ、25
審査請求日	平成18年3月24日(2006.3.24)	(74) 代理人	100069556
(31) 優先権主張番号	A1159/98		弁理士 江崎 光史
(32) 優先日	平成10年7月2日(1998.7.2)	(74) 代理人	100092244
(33) 優先権主張国	オーストリア(AT)		弁理士 三原 恒男
		(74) 代理人	100093919
			弁理士 奥村 義道

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】改良された基質受容を有する (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ及びその使用方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

改良された基質受容を有しかつ *Hevea brasiliensis* 又は *Manihot esculenta* (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼに由来する (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼに於て、位置 1 2 8 番目のトリプトファン残基を、アラニン、グリシン、バリンおよびフェニルアラニンからなる群から選択されるアミノ酸残基で置き代えることを特徴とする、上記リアーゼ。

【請求項 2】

*Hevea brasiliensis* 又は *Manihot esculenta* から得られる組換え (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼに由来する、請求項 1 記載の (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 3】

組換え (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼの配列が完全な形であるか又は切りつめられている、請求項 2 記載の (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 4】

位置 1 2 8 番目のトリプトファン残基をアラニン又はフェニルアラニンで置き代える、請求項 1 記載の (S) - ヒドロキシニトリルリアーゼ。

【請求項 5】

クイックチェンジサイト - 直接変異誘発キットを用いて、活性中心に至る疎水性チャンネル内で突然変異を行うことを特徴とする、請求項 1 記載の (S) - ヒドロキシニトリ

ルリアーゼを製造する方法。

【請求項 6】

(S)-シアノヒドリンを製造するために、請求項 1 記載の(S)-ヒドロキシニトリルリアーゼを使用する方法。

【請求項 7】

脂肪族及び芳香族アルデヒド及びケトンにシアニド基ドナーの存在下に請求項 1 記載の(S)-ヒドロキシニトリルリアーゼと反応させることを特徴とする(S)-シアノヒドリンの製造方法。

【請求項 8】

有機相、水性相又は 2 - 相系中で又はエマルジョン中で反応を遂行する、請求項 7 記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

生物触媒 (biological catalyst) による化学反応の実施は、特にこれを使用する領域でますます重要性を増している。その使用の際、酵素に於てしばしば顕著である性質をキラル又はプロキラル成分を用いる反応で 2 つの対掌体のうちの 1 つを優先的に変換ことに利用することができる。

【0002】

【従来の技術】

20

酵素のこのグループは、ヒドロキシニトリルリアーゼ (HNL) 族、特に *Hevea brasiliensis* HNL (HbHNL) 及び *Manihot esculenta* HNL (HeHNL) を包含する。この 2 つの酵素は、高い配列同定を示し、“ / ヒドロラーゼ折りたたみ (fold) ” タイプのたん白質に属する。このタイプは特徴的な第三折りたたみ及び活性中心としてアスパラギン酸、セリン及びヒスチジンを含有する、いわゆる触媒三つ組 (triad) 軸を示す。この際、活性中心は、疎水性チャンネルの内部末端に位置する。

【0003】

原則として、HbHNL 及び MeHNL は、大多数のカルボニル化合物、たとえば脂肪族、脂環式、不飽和、芳香族及びヘテロ芳香族アルデヒド及びケトンに対応する (S)-シアノヒドリンへ変換するのに適する。HNLs は絶えず (S)-シアノヒドリンを製造するためのバイオ触媒 (biocatalyst) としてより一層の重要性を増しているため、種々の試みがその触媒活性及び基質受容を改良するために常になされている。今まで得られている HNL の基質受容は、大きい残基を有する出発化合物の場合満足のものではなく、その結果として対応するシアノヒドリンが低い変換率で及び (又は) 低い対掌体過剰 (enantiomeric excess) で得られる。

30

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

したがって本発明の目的は、改良された基質受容を有する (S)-ヒドロキシニトリルリアーゼを提供することにある。

【0005】

40

【課題を解決するための手段】

それ故に、本発明は、変えられた基質受容、特に特定の基質の場合に改良された基質受容を有しかつ *Hevea brasiliensis* 及び *Manihot esculenta* から得られる (S)-ヒドロキシニトリルリアーゼに由来する (S)-ヒドロキシニトリルリアーゼに於いて、活性中心に至る疎水性チャンネル内の大きい (bulky) アミノ酸残基 1 種又はそれ以上を、それよりも大きくない (less bulky) アミノ酸残基によって置き換えることを特徴とする、上記 (S)-ヒドロキシニトリルリアーゼに関する。

【0006】

本発明による HNL は、*Hevea brasiliensis* (HbHNL) 又は *Manihot esculenta* (MeHNL) (S)-HNLs の変異体であり、これは組換えで修飾された微生物、たとえば

50

ピチアパストリス(*Pichia pastoris*)、サッカロマイセスセレヴィシアエ(*Saccharomyces cerevisiae*)又は大腸菌(*Escherichia coli*)から得ることができる(WO 97/03204)。

【0007】

この場合、修飾すべき組換えHNLSは、一部切りつめられている(truncated)配列を有していてもよく、この配列はたとえば配列中で第一アミノ酸を除くことによって得られる。

【0008】

変異体は、活性中心に至る疎水性チャンネルを生じるこれらのアミノ酸の変性された配列を有する。

【0009】

この場合、個々の大きいアミノ酸残基又はいくつかの大きいアミノ酸残基は、それよりも大きくないアミノ酸残基に置き換えられる。

【0010】

大きいアミノ酸残基としてトリプトファンをこれよりも大きくないアミノ酸残基、たとえばアラニン、グリシン、バリン又はフェニルアラニンで置き換えるのが好ましい。

【0011】

特に好ましくは、HbHNLS又はMeHNLSの完全な配列の位置128のトリプトファンがアラニン又はフェニルアラニンによって置き換えられている変異体である。

【0012】

本発明によるHNLSを、組換えで修飾された微生物、たとえば *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae* 又は大腸菌中で、たとえば M. Hasslacher等, *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 5884 又は Wajant, H. 及び Pfizenmaier, K. 1996, *J. Biol. Chem.* 25830-24834 と同様に機能的に過発現させることによって産生する。この変異は、たとえばクイックチェンジサイト-直接変異誘発キット(Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit) (Stratagene) を用いて製造業者の仕様書に従って行われる。このクイックチェンジサイト-直接変異誘発キットは、特定の変異体を産生するのにすぐに使用できるシステムであり、たとえばストラータジーン・クローニング・システム(Stratagene Cloning Systems)、La Jolla, CA (米国)によって市販されている。

【0013】

得られたHNLSを標準法、たとえば Wajant, H. Pfizenmaier, K., *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 25830-25834 と同様に精製する。

【0014】

本発明のHNLSは、従来技術に比して優れた変換率及び(又は)より高い対掌体過剰で(S)-シアノヒドリンを産生するのに適する。

【0015】

本発明のHNLSを、特に脂肪族及び芳香族アルデヒド及びケトンを基質として使用する場合に使用する。

【0016】

この際、脂肪族アルデヒドは炭素原子2~20個を有する飽和又は不飽和の、分枝状又は環状アルデヒドであるのが好ましい。

【0017】

特に好ましくは、炭素原子4~18個を有する飽和又は不飽和分枝状アルデヒドである。

【0018】

脂肪族及び芳香族アルデヒドは、置換されていないか又は反応条件下に不活性である基、たとえば場合により置換されたアリール-又はヘテロアリール基、たとえばフェニル基又はインドリル基、又はハロゲン、エーテル、アルコール、アシル、カルボン酸、ニトロ又はアジド基によって置換されていてよい。

【0019】

適当な脂肪族アルデヒドとして、たとえばヘキサナル、ヘキセナル、ヘプタナル、プロパナル、オクタナル、オクテナル及び2-メチルプロパナルが挙げられる。

10

20

30

40

50

## 【0020】

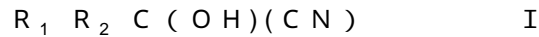
適当な芳香族又はヘテロ芳香族基質として、たとえばベンズアルデヒド又は種々に置換されたベンズアルデヒド、たとえば3-フェノキシベンズアルデヒド、4-フルオロ-3-フェノキシベンズアルデヒド、2-クロロベンズアルデヒド、2-ニトロベンズアルデヒド、4-メチルベンズアルデヒド等々が挙げられる。

## 【0021】

この基質を本発明のHNLSの存在下にシアニド基ドナーと反応させる。

## 【0022】

適当なシアニド基ドナーは、シアン化水素、アルカリ金属のシアン化物又は一般式



のシアノヒドリンである。

10

## 【0023】

式Iに於て、 $R_1$ 及び $R_2$ は相互に独立して水素又は非置換の炭化水素残基を示すか又は $R_1$ 及び $R_2$ は一緒になって炭素原子4又は5個を有するアルキレン基を示す。但しこの際 $R_1$ 及び $R_2$ は同時に水素を示さない。炭化水素残基は脂肪族又は芳香族、好ましくは脂肪族基である。 $R_1$ 及び $R_2$ は炭素原子1~6個を有するアルキル基を示すのが好ましい。シアニド基ドナーは、アセトンシアノヒドリンであるのが極めて好ましい。

## 【0024】

シアニド基ドナーを、公知方法によって製造することができる。シアノヒドリン、特にアセトンシアノヒドリンも市場で入手することができる。

20

## 【0025】

シアン化水素(HCN)、KCN、NaCN又はアセトンシアノヒドリンを、シアニド基ドナーとして使用するのが好ましい。但しこの際シアン化水素を使用するのが特に好ましい。

## 【0026】

この場合、シアン化水素をその塩、たとえばNaCN又はKCNのうちの1つから、反応直前に遊離し、物質そのものとして又は溶解された形で反応混合物に加えることもできる。

## 【0027】

反応を有機相、水性相又は2-相システム中で又はエマルジョン中で実施することができる。

30

## 【0028】

使用される水性相は、本発明のHNLSを含有する水溶液又は緩衝液である。この溶液又は緩衝液としては、クエン酸ナトリウム緩衝液、リン酸塩緩衝液等々が挙げられる。

## 【0029】

使用される有機希釈剤は、水と混和しないか又はほんの僅かしか混和しない脂肪族又は芳香族炭化水素であってよく、これは場合によりハロゲン化されたアルコール、エーテル又はエステル又はそれらの混合物であってよい。メチル $t$ -ブチルエーテル(MTBE)、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル又は酢酸エチル又はこれらの化合物の混合物を使用するのが好ましい。

40

## 【0030】

この場合、本発明のHNLSを有機希釈剤中にそのまま又は固定化して存在させることができる。しかし反応を非固定化HNLSを用いて2相系中で又はエマルジョン中で実施することもできる。

## 【0031】

## 【実施例】

次に本発明を例によって説明する。

## 〔例1〕

位置128で変異されたHbHNLSの産生。

## 【0032】

50

特異変異体を Quik Change™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, USA) を用いて産生する。HNLたん白質の位置128のアミノ酸交換とは別に、制限酵素A c c IIIに対する切断部位を、サイレント変異によって更に導入する。

【0033】

次のオリゴヌクレオチドをこの目的のために使用する：

a) 変異体W128Aを産生するために：

【0034】

【配列表】

W128AFOR: 5' GCTCATGGAGGTGTTTCCGGACGCAAAGACACCACG 3'

10

W128AREV: 5' CGTGGTGTCTTTTGCCTCCGGAACACCTCCCATGAGC 3'

【0035】

b) 変異体W128Fを産生するために：

【0036】

【配列表】

W128FFOR: 5' GCTCATGGAGGTGTTTCCGGACTTCAAAGACACCACG 3'

W128FREY: 5' CGTGGTGTCTTTGAAGTCCGGAACACCTCCCATGAGC 3'

【0037】

20

Hevea brasiliensis hnl遺伝子のcDNAを有する組換えプラスミドpHNL104を変異誘発反応に対する鑄型として使用する(plasmid preparation in analogy with Haslacher 等. 1996 J. Biol. Chem. 271, 5884)。次いで変異されたプラスミドで大腸菌を形質転換する[Epicurian Coli (登録商標) XL1 La Jolla, CA, 米国)。

【0038】

次いでプラスミドDNAをいくつかの形質転換体から単離し、変異と共に導入されたA c c III切断部位の存在について制限酵素A c c IIIで調べる。次いで正のクローンを、位置128の所望の変異の存在を立証するために及び望まない変異がhnl遺伝子の他の領域に導入される可能性を排除できるように、hnl cDNAの領域で配列分析に付す。

【0039】

30

夫々の変異されたHNLをコードするフラグメントを制限エンドヌクレアーゼE<sub>co</sub>R Iによる消化、次いでアガロースゲル電気泳動によって対応するプラスミドから単離する。このフラグメントを発現ベクターpHIL-D2のDNA (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, 米国) に連結する。このDNAはE<sub>co</sub>R Iで線状化され、アルカリホスファターゼで脱ホスホリル化されている。この組換えDNAで大腸菌SURE (登録商標) (Stratagene cloning Systems, LaJolla, CA, 米国) を形質転換する。

【0040】

プラスミドDNAをもう一度いくつかの形質転換体から産生し、制限エンドヌクレアーゼNde Iを用いてpHIL-D2のaoxIプロモーターに対するhnl cDNAの存在及び(又は)配向について調べる。

40

【0041】

適当なクローンからプラスミドDNAを制限酵素Not Iで線状化し、次いで電気形質転換(electrotransformation)によってPichia pastoris 株GS115に導入する。但しその選択は使用される宿主株のヒスチジン栄養要求の相補に対して行われる。この様にして得られた形質転換体を次いで最小メタノール培地上で減数増殖についてテストする。次いでいくつかのこの様なMut<sup>s</sup>形質転換体を、HNLたん白質を発現するその能力に関してテストし、適する発現株を2つのHNL変異体の夫々に対して選択する。この処理は、Pichia 発現キット(Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, 米国) を用いる説明書中に詳述されている実験と同様に行われる。Pichia pastoris ゲノムへのhnl cDNAの組み込み及び2つの発現株中に特異変異の存在を、PCRによって増幅されたDNAフラ

50

グメントを配列することによって確かめる。Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, Vols. 1-3, Greene Publishing Associates 及び Wiley-Interscience, ニューヨーク, 1995, に記載された方法を用いて単離された染色体 DNA は、PCR に対する鋳型として役立つ。PCR プライマーの配列は次の通りである:

【配列表】

PP5AOX1 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

PP3AOX1 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

PP5AOX1 5' GACTGGTTCCAATTGACAAGC 3'

10

PP3AOX1 5' GCAAATGGCATTCTGACATCC 3'

発現株を醗酵し、変異された HNL たん白質を Hasslacher 等, 1997, Protein Expression and Purification, 11, 61-71 に記載されている様に単離し、精製する。

〔例 2〕

位置 128 が変異された MeHNL の産生。

【0042】

変異をクイックチェンジサイト-直接変異誘発キット (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA, 米国) を用いて pQE4-MeHNLwt に変える。このために 2 個の相補プライマー これは MeHNL のヌクレオチド 383-435 (5' AAG CTT TTG GAG TCG TTT CCT GAC GCG AGA GAC ACA GAG TAT TTT ACGTTC AC 3') に相当し、所望の変異 (下線部分) を含有する を、Pfu DNA ポリメラーゼを用いて伸長し、生じる生成物を DpnI で処理する。次いで変異されたプラスミドで大腸菌 XL1ブルーを形質転換する。変異体を T7 DNA 分析システム (Pharmacia) を用いて Sanger 等 (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. 米国, 74, 5463-5467 と同様に变化された測定法による配列分析によって確かめる。

20

〔例 3〕

(S)-3-フェノキシベンズアルデヒドシアノヒドリンの産生。

【0043】

(S)-3-フェノキシベンズアルデヒドシアノヒドリン (PBAC) が、m-フェノキシベンズアルデヒド (PBA) 10 又は 5 mmol 夫々と HCN 14.4 又は 7.7 mmol 夫々と t-ブチルメチルエーテル (MTBE) 中で、位置 128 がアラニンで置換されている MeHNL W128A 又は組換え MeHNL (J. Hughes 等, Arch. Biochem. Biophys. 1994, 311(2), pp. 496-502) 又は組換え HbHNL-Ex. 変異体の存在下に反応させることによって得られる。

30

【0044】

このために、夫々の場合、酵素液 1.3 ml (HbHNL の場合 0.26 ml) を 50 mmol クエン酸ナトリウム緩衝液 8.3 ml、pH 5.4 (HbHNL の場合蒸留水 9.74 ml) で希釈し、その後適量の PBA (1.98 g / 1 g) 及び MTBE 3 又は 1.5 ml を加える。次いでアルデヒド 0.06 ml (HCN / ml) を急速に滴加する。反応の経過を、IP モニターを用いてアルデヒド含有量の減少によって追跡する。反応を 2 時間後停止する。後処理のために、反応液を夫々の場合 MTBE 2.5 ml で希釈し、振とうし、遠心分離する。その結果は表 1 に示される。

40

【0045】

表 1

	IU/ml	mmol of PBA	PBACの含 有率(%)	ee (%)
MeHNL (野性型)	1092	10	82	n. d.
MeHNL (野性型)	1092	5	88.5	97.03
MeHNL (W128A)	315	10	98.7	n. d.
MeHNL (W128A)	315	5	97*)	97
HbHNL	5200	10	83	n. d.
HbHNL	5200	5	84.5	n. d.

\*) 1.5 時間後

n.d. 測定されなかった

【例 4】

有機培地中で、*Manihot esculenta* からの組換え MeHNL (野性型) と変異体 MeHNL W128A の比較。

【0046】

例 3 と同様に、酵素 3 mg、ニトロセルロース 100 mg (20 mmol クエン酸塩緩衝液、pH 3.3 で調製)、基質 1 mmol 及び HCN 150  $\mu$ l をジイソプロピルエーテル 5 ml 中で反応させる。

【0047】

その結果を表 2 中に示す。

【0048】

10

20

30

表 2

基質	MeHNL			W128A		
	t(h)	収率 (%)	ee (%)	t(h)	収率 (%)	ee (%)
ノナナル	6	35	81.1	6	87.3	80.2
ヘプタナル	1	99	80	1	99.5	88
2-メチル- ブタナル	4.5	89	93.6	4.5	99	96.6
2-ヘキセナル	3.2	21.1	>99	3.2	85	96
n-PBA	7	30	99	8	82	99
p-HBA	2	31	>99	2	60	>99
CPA	1	90.7	99	1	94.3	99
PPA	0.3	79	67	0.3	93	86
フェニル- アセトン	4	69.8	99	4	81.6	96
BMK	4.5	100	52	4.5	100	78
BEK	5	40	45	5	46	82

p-HBA p-ヒドロキシベンズアルデヒド

PPA フェニルプロピオンアルデヒド

CPA シクロペンテン-1-イルアセトアルデヒド

BMK ブチル メチル ケトン

BEK ブチル エチル ケトン

〔例5〕

水性緩衝系中で組換えMeHNLと変異体MeHNL W128Aを比較。

【0049】

例3と同様に、0.5Mクエン酸ナトリウム緩衝液2.5ml中に基質0.5mmolと共にある酵素1.2mgをKCN 1mmolと0.5Mクエン酸ナトリウム緩衝液3.5ml、pH3.8中で反応させる。

【0050】

その結果を表3中に示す。

表 3

基質	MeHNL			W128A		
	t (h)	収率 (%)	ee (%)	t (h)	収率 (%)	ee (%)
FPBA	4	11	99	4	47	95
PBA	22	66	97	22	75	92
m-HBA	3	74	0	3	80	0
p-HBA	1	76	92	1	71	96
PPA	1.2	60	21	1.2	94	90

10

FPBA 4-フルオロ-3- フエノキシベンズアルデヒド

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
C 1 2 R 1:91
- (74)代理人 100111486  
弁理士 鍛冶澤 實
- (72)発明者 フランツ・エッフエンベルガー  
ドイツ連邦共和国、7 0 5 9 7 シュトウツガルト、シャッツヴェーク、5
- (72)発明者 ハラルト・ヴァジャント  
ドイツ連邦共和国、7 0 7 7 1 ラインフェルデン - エヒターデインゲン、ゾンネンビュール、2
- (72)発明者 ペーター・ラウブル  
ドイツ連邦共和国、1 0 9 6 5 ベルリン、カツパッハストラッセ、3 2
- (72)発明者 ジーグフリート・フェルスター  
ドイツ連邦共和国、7 0 5 6 9 シュトウツガルト、ボーゲンストラッセ、9 エー
- (72)発明者 ホルガー・ビューラー  
ドイツ連邦共和国、7 1 6 4 0 ルートウィヒスブルク、ルードルフ - グライナー - ストラッセ、1 4
- (72)発明者 ヘルムート・シュウアーブ  
オーストリア国、8 0 4 3 グラーツ、マリアグリュナーストラッセ、9 3
- (72)発明者 クリストフ・クラッキー  
オーストリア国、8 0 1 0 グラーツ、アム・ドミニカナーグルンド、3 8
- (72)発明者 ウルリケ・ヴァーグナー  
オーストリア国、8 0 1 0 グラーツ、クレンガッセ、3 0
- (72)発明者 エルンスト・シュタイナー  
オーストリア国、8 1 4 4 トーベルバート、バートストラッセ、1 1

審査官 横田 倫子

- (56)参考文献 特開平 0 5 - 3 1 7 0 6 5 ( J P , A )  
特開平 0 6 - 2 2 8 0 7 5 ( J P , A )  
国際公開第 9 7 / 0 0 3 2 0 4 ( W O , A 1 )  
国際公開第 9 8 / 0 3 0 7 1 1 ( W O , A 1 )  
J Biol Chem., 271 [42] (1996) p.25830-25834  
PROTEINS: Structure, Function, Genetics, 27 (1997) p.438-449  
Structure, 4 (1996) p.811-822  
Protein Sci., 11 (2002)p.65-71  
J Mol Catal B: Enzymatic., 5 (1998) p.343-347

## (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/00-15/90  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)  
PubMed  
BIOSIS/WPI(DIALOG)