

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7142813号
(P7142813)

(45)発行日 令和4年9月28日(2022.9.28)

(24)登録日 令和4年9月16日(2022.9.16)

(51)国際特許分類

C 12 N	15/53 (2006.01)	F I	C 12 N	15/53
C 12 P	7/02 (2006.01)		C 12 P	7/02
C 12 N	9/02 (2006.01)		C 12 N	9/02

Z N A

請求項の数 15 (全45頁)

(21)出願番号 特願2019-547195(P2019-547195)
 (86)(22)出願日 平成29年11月15日(2017.11.15)
 (65)公表番号 特表2019-536479(P2019-536479
 A)
 (43)公表日 令和1年12月19日(2019.12.19)
 (86)国際出願番号 PCT/GB2017/053432
 (87)国際公開番号 WO2018/091885
 (87)国際公開日 平成30年5月24日(2018.5.24)
 審査請求日 令和2年11月11日(2020.11.11)
 (31)優先権主張番号 1619344.3
 (32)優先日 平成28年11月15日(2016.11.15)
 (33)優先権主張国・地域又は機関
 英国(GB)

(73)特許権者 519174012
 ハイファ ディスカバリー リミテッド
 イギリス オーエックス 14 4エスディ
 - アビンドン ミルトン パーク ブルッ
 ク ドライブ 154 ピー
 110002860
 (74)代理人 特許業務法人秀和特許事務所
 スチール, ジョナサン チャールズ ポール
 イギリス ミドルセックス UB8 3 PQ
 (72)発明者 アクスブリッジ キングストン レーン
 ブルーネル サイエンス パーク ラッセル
 ビルディング ハイファ ディスカバリー
 リミテッド内
 デ リゾ, アントニオ
 イギリス ミドルセックス UB8 3 PQ
 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 アミコラトプシス・ルリダ由来シトクロム P 4 5 0 を用いた分岐状脂肪族または芳香族基質のヒドロキシ化法

(57)【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒドロキシ化有機化合物の生産法であって、有機化合物と、配列番号 3 を含むシトクロム P - 4 5 0 酵素、または配列番号 3 と少なくとも 98.4 % の同一性を有し且つ C Y P - 4 5 0 活性を有する変異型酵素とを反応させることを含み、前記シトクロム P - 4 5 0 酵素がプロピル基またはブチル基のヒドロキシ化を触媒するために使用される、生産法。

【請求項 2】

イソプロピル基またはイソブチル基のヒドロキシ化を触媒するために前記酵素が使用される、請求項 1 に記載の方法。

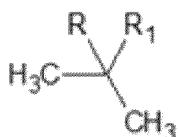
【請求項 3】

t e r t - ブチル基のヒドロキシ化を触媒するために、前記酵素が使用される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

式 (I I) の化合物のヒドロキシ化を触媒するために前記酵素が使用され、

【化1】



(I I)

式中、Rは化合物の残りの部分を表し、R¹はCH₃またはHである、請求項1～3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

ヒドロキシ化される化合物が、ボセンタン、ブバルバコン、BIRB796またはリトナビルである、請求項1～4のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項6】

前記シトクロムP-450酵素が、還元酵素成分と併用される、請求項1～5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記還元酵素成分がフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素成分である、請求項6に記載の方法。

【請求項8】

前記シトクロムP-450酵素が、配列番号3を含むシトクロムP-450酵素である、請求項1～7のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項9】

前記シトクロムP-450酵素が、精製された形態、部分精製された形態、粗酵素抽出物、組換え宿主細胞に存在する形態、または天然宿主細胞に存在する形態である、請求項1～8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記シトクロムP-450酵素またはその変異型がアミコラトプシス・ルリダ(NRR-L-2430)細胞に存在し、且つ、前記細胞がヒドロキシ化される有機化合物を投与される、請求項1～9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

前記投与の後、前記細胞が回収および精製されることで前記ヒドロキシ化された化合物が得られる、請求項10に記載の方法。

30

【請求項12】

前記シトクロムP-450酵素またはその変異型が、前記酵素をコードする異種核酸を含む少なくとも1種の組み換え微生物によって発現され、前記少なくとも1種の組み換え微生物がヒドロキシ化される有機化合物を投与される、請求項1～11のいずれか一項に記載の方法。

【請求項13】

前記投与の後、精製工程にかけられることで、前記ヒドロキシ化された化合物が得られる、請求項12に記載の方法。

40

【請求項14】

前記ヒドロキシ化がpH5～12で起こる、請求項1～13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記ヒドロキシ化がpH8～11で起こる、請求項14に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は有機基質のヒドロキシ化を触媒するためのシトクロムP-450酵素の使用に関する。

50

【背景技術】

【0 0 0 2】

シトクロム P 450 (CYP) はヘム - チオレートタンパク質のスーパーファミリーであり、それらに一酸化炭素が結合した化学種が 450 nm に吸光度スペクトルのピークを有することから命名がなされた。シトクロム P 450 は動物、植物、真菌、原生生物、細菌、古細菌 (archaea) 等の全ての生物界に存在しており、さらに、巨大ウイルスである多食アメーバ (A. polyphaga) 由来の、P 450 と推定されるものが最近報告された (Lamb, DC; Lei, L; Warrilow, AG; Lepesheva, GI; Mullins, JG; Waterman, MR; Kelly, SL (2009). "The first virally encoded cytochrome P450". *Journal of Virology*. 83 (16): pp8266-9)。シトクロム P 450 は大腸菌 (E.coli) では確認されていない (Roland Sigel; Sigel, Astrid; Sigel, Helmut (2007). *The Ubiquitous Roles of Cytochrome P450 Proteins: Metal Ions in Life Sciences*. New York: Wiley. ISBN 0-470-01672-8; Danielson PB (December 2002). "The cytochrome P450 superfamily: biochemistry, evolution and drug metabolism in humans". *Curr. Drug Metab.* 3 (6): pp561-97)。

10

【0 0 0 3】

シトクロム P 450 はその反応化学特性において驚くほどの多様性を示し、多様な一連の内在性基質および生体異物基質の酸化的代謝、過酸化的代謝および還元的代謝を支えている。

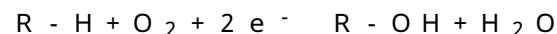
20

【0 0 0 4】

ヒトにおいては、シトクロム P 450 は第 I 相の薬物代謝におけるその中心的役割で最もよく知られており、そこでは、シトクロム P 450 が、臨床薬理学において最も重大な問題のうちの 2 つ、すなわち薬物相互作用および薬物代謝における個体間変動、において決定的な重要性をもつ。

【0 0 0 5】

シトクロム P 450 によって触媒される最も一般的な反応はモノオキシゲナーゼ反応である。シトクロム P 450 モノオキシゲナーゼはヘム基を利用して分子を酸化し、しばしば、極性基の付加または露出によって分子をより水溶性にする。一般的に、これらの酵素によって触媒される反応は以下のようにまとめることができる：



30

【0 0 0 6】

式中、R - H は基質であり、R - OH は酸素が付加された基質である。前記酸素は CYP 酵素の中心にあるヘム基に結合し、水素イオン (H+) は通常、CYP 酵素の特定のアミノ酸を通じて還元された補因子 NADH または NADPH に由来する。CYP 酵素は、シトクロム b5、フェレドキシン還元酵素とフェレドキシン、およびアドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシン等の、一連の酸化還元パートナータンパク質から電子を受け取ることができる。

【0 0 0 7】

シトクロム P 450 の分類および命名法はかなり複雑であるが、I. Hanukoglu (1996). "Electron Transfer Proteins of Cytochrome P450 Systems". *Advances in Molecular and Cell Biology*. *Advances in Molecular and Cell Biology*. 14: 29-56 によって提唱

40

されている、それらの酸化還元パートナー輸送タンパク質系によって分類することができる。要約すると、シトクロム P 450 は以下の群に分類できる。

電子を補因子からシトクロム P 450 に移動させるためにシトクロム P 540 還元酵素またはシトクロム b5 を利用するミクロソーム型 P 450 系；

電子を還元された補因子からシトクロム P 450 に移動させるためにアドレノドキシン還元酵素とアドレノドキシンを利用するミトコンドリア型 P 450 系；

電子を還元された補因子からシトクロム P 450 に移動させるためにフェレドキシン還元

50

酵素とフェレドキシンを利用する細菌型 P 4 5 0 系；
 補因子からシトクロム P 4 5 0 への電子移動のためにシトクロム b 5 を利用する C Y B 5
 R - c y t b 5 - P 4 5 0 系；
 電子パートナー還元酵素が縮合 F M N ドメインである F M N - F d - P 4 5 0 系；
 酸化還元パートナータンパク質を必要としない P 4 5 0 のみの系、例えば、P 4 5 0 B M -
 3。

【 0 0 0 8 】

単離された細菌性のシトクロム P 4 5 0 酵素は公知であり、プチダ菌 (*Pseudomonas putida*) 由来の P 4 5 0 c a m (J Biol Chem (1974) 249, 94) ; 共に巨大菌 (*Bacillus megaterium*) (ATCC 14581) 由来の P 4 5 0 B M - 1 および P 4 5 0 B M - 3 (Biochim Biophys Acta (1985) 838, 302、および J Biol Chem (1986) 261, 198 10 6, 7160)

; ダイズ根粒菌 (*Rhizobium japonicum*) 由来の P 4 5 0 a、P 4 5 0 b、および P 4 5 0 c (Biochim Biophys Acta (1967) 147, 399) ; 並びに、ノカルジア N H I (Nocardia

N H I) 由来の P 4 5 0 n p d (Microbios (1974) 9, 119) が挙げられる。

【 0 0 0 9 】

しかし相対的に、放線菌微生物から精製されたシトクロム P 4 5 0 酵素は報告がないままである。Biochem and Biophys Res Comm (1986) 141, 405には、大豆粉によるストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) におけるシトクロム P - 4 5 0 の誘導 (P 4 5 0 s o y) が記述されている。他の報告された例としては、Biochemistry (1987) 26, 6204に記載される、サッカロポリスボラ・エリスラエア (*Saccharopolyspora erythraea*) (元々はストレプトマイセス・エリスラエウス (*Streptomyces erythraeus*) に分類) からの、農薬不活性化の効果を及ぼす P 4 5 0 の 2 つの形態 (P 4 5 0 s u 1 および P 4 5 0 s u 2) 並びに 6 - デオキシリトロノリド B ヒドロキシラーゼの 20 20 2 つの形態の単離および特性が挙げられる。米国特許第 6 8 8 4 6 0 8 号には、アミコラトプシス・オリエンタリス (*Amycolatopsis orientalis*) (元々はストレプトマイセス・オリエンタリス (*Streptomyces orientalis*) に分類) の菌株によって產生されるヒドロキシ化酵素に

よって果たされる、エポチロン B のエポチロン F への酵素的ヒドロキシ化が記述されている。

【 0 0 1 0 】

医薬品化学の分野では、化学物質の特性を改変するために、化学物質の修飾が用いられている。例えば、薬らしい分子の合成において、医薬品化学者は疎水性の導入のために第三ブチル部分をしばしば使用する。しかし、そのさらなる修飾により、係る化合物の力価プロファイル、選択性プロファイルおよび溶解性プロファイルを向上させてもよく、例えばヒドロキシ化を用いることができる。ヒドロキシ化はまた、薬理学および医薬品化学の別の重要な側面である代謝分解の主要な経路でもある。動物組織による生体内変換を用いた、これらのヒドロキシ化された代謝産物の生産法が求められている。

【 発明の概要 】

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

驚くべきことに、アミコラトプシス・ルリダ (*Amycolatopsis lurida*) (N R R L - 2 4 3 0) に存在するシトクロム P - 4 5 0 酵素を、広範囲の有機基質のヒドロキシ化に使用できることが分かった。

【 0 0 1 2 】

特に配列番号 3 を有するシトクロム P - 4 5 0 酵素は、化合物の物理化学的特性および薬理学的特性の活性化または改変を目的とした、有機化合物のヒドロキシ化に使用することができる。特に好ましい実施形態では、配列番号 3 を有するシトクロム P - 4 5 0 酵素は、化合物の物理化学的特性や薬理学的特性の C - H 活性化または C - H 修飾を目的とし

10

20

30

40

50

た、イソプロピル部分もしくは第三ブチル部分、またはそのような部分を含む化学物質のヒドロキシ化に使用される。

【0013】

本発明の第一の態様は、有機化合物をヒドロキシ化するための、配列番号3を含むシトクロムP-450酵素、または配列番号3と少なくとも70%の同一性を有し且つCYP-450活性を有する変異型酵素の使用を提供する。

【0014】

本発明の第二の態様は、有機化合物と、配列番号3を含むシトクロムP-450酵素、または配列番号3と少なくとも70%の同一性を有し且つCYP-450活性を有する変異型酵素を部分的に含有する酵素調製物とを反応させることを含む、ヒドロキシ化された有機化合物の生産法を提供する。 10

【0015】

本発明の第三の態様は、i) 配列番号3を含むシトクロムP-450酵素、もしくは配列番号3と少なくとも70%の同一性を有し且つCYP-450活性を有する変異型酵素、または、ii) 配列番号3を含むシトクロムP-450酵素、もしくは配列番号3と少なくとも70%の同一性を有し且つCYP-450活性を有する変異型酵素を発現する微生物を含み、有機化合物をヒドロキシ化するための使用される説明書および他の補因子試薬をさらに含む、キットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1A】 本発明によって発揮される生体内変換の例を模式的に示している。図1(a)はボセンタンのヒドロキシ化を示しており；図1(b)はブバルバコンのヒドロキシ化を示しており；図1(c)はリトナビルのヒドロキシ化を示している。 20

【図1B】 本発明によって発揮される生体内変換の例を模式的に示している。図1(d)はチバンチニブのヒドロキシ化を示しており；図1(e)はジクロフェナクのヒドロキシ化を示している。

【図2A】 様々なID配列を示している。配列番号1はP450aaluc09およびフェレドキシンaaluf03の核酸配列であり；配列番号2はP450aaluc09およびフェレドキシンaaluf03のコード配列である。

【図2B】 様々なID配列を示している。配列番号3はP450Aluc09のアミノ酸配列であり；配列番号4はフェレドキシンA1uf03のアミノ酸配列であり；配列番号9は、DNA2.0製の、NdeIおよびNotIによりpD454-SRプラスミドにサブクローニングされた合成DNAである。 30

【図2C】 様々なID配列を示している。配列番号10はフェレドキシンFd1のアミノ酸配列であり；配列番号11はフェレドキシン還元酵素SCF15Aのアミノ酸配列である。

【図2D】 様々なID配列を示している。配列番号14はフェレドキシン還元酵素camAおよびフェレドキシンcamBのコード配列である。

【図2E】 様々なID配列を示している。配列番号15はフェレドキシン還元酵素CamAのアミノ酸配列であり；配列番号16はフェレドキシンCamBのアミノ酸配列であり；配列番号23は、ジェンスクリプト社(Genscript)製の、NdeIおよびNotIによりpET29aにサブクローニングされた合成DNAである。 40

【図2F】 様々なID配列を示している。配列番号24は切断型P450BM3のアミノ酸配列である。

【図2G】 様々なID配列を示している。配列番号25はP450BM3の還元酵素ドメインとインフレームで融合されたP450aaluc09のコード配列である。

【図2H】 様々なID配列を示している。配列番号26はP450BM3の還元酵素ドメインとインフレームで融合されたP450Aluc09のアミノ酸配列である。

【図3】 P450aaluc09タンパク質(矢印を参照)を含有する粗酵素抽出物のSDS-PAGE解析を示している。試料はpQR368bb-aluc09-aluf03プ

10

20

30

40

50

ラスミドを含有する大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s S 細胞の I P T G 誘導培地から調製した。

【図4】P 4 5 0 a l u C 0 9 タンパク質を含有する粗酵素抽出物の一酸化炭素差スペクトル (carbon monoxide difference spectrum) を示している。試料は p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3 プラスミドを含有する大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s S 細胞の I P T G 誘導培地から調製した。

【図5 A】1 0 0 μL のスクリーニング規模で行われた各種反応の超高速高分離液体クロマトグラフィー (U P L C) のクロマトグラムを示している。

【図5 B】同上。

【図5 C】同上。

【図5 D】同上。

【図5 E】同上。

【図5 F】同上。

【図5 G】同上。

【図6】D M S O - d 6 中の O H - ボセンタンの 1 H - N M R スペクトル (上段) と D M S O - d 6 中のボセンタン (下段) との比較。3 . 4 2 p p m における新たなシグナルの出現 (2 H、二重線、C H₂ O H) と、ヒドロキシボセンタンにおける 6 H と比較した場合のボセンタンにおける 9 H からのメチルシグナル積分値の減少とから、ヒドロキシ化の場所が t - ブチル基であることが確認される。

【図7】ブバルバコン (上段) と比較した H O - ブバルバコン (下段) の D M S O - d 6 中の 1 H - N M R スペクトル。4 . 3 1 p p m (1 H、三重線、ヒドロキシプロトン) および 3 . 1 2 p p m (2 H、二重線、C H₂ O H) における新たなシグナルの出現と、ヒドロキシブバルバコンにおける 6 H と比較した場合のブバルバコンにおける 9 H からのメチルシグナル積分値の減少とから、ヒドロキシ化の場所が t - ブチル基であることが確認される。

【図8】D M S O - d 6 中の - H O - N - メチルイソプロピルチアゾロイルメチル - リトナビルのH M B C N M R スペクトル。イソプロピルメチルシグナルは 1 . 4 9 p p m および 1 . 4 8 p p m の一重線であり、7 1 . 5 p p m のヒドロキシ化された架橋炭素、1 8 1 p p m のチアゾリル炭素、および 3 0 p p m の互いの炭素に対して相関性を示している。新たなヒドロキシプロトンは 5 . 9 1 p p m の一重線として明らかであり、同じ炭素に対して相関性を示している。7 . 1 6 p p m のチアゾリルプロトン - 重線も 1 8 1 p p m の前記炭素と相関している。

【図9】発現ベクター p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3。

【図10】異なる反応 p H における凍結乾燥された (Iyophilised) 酵素調製物の無細胞活性試験から得られたヒドロキシ - ボセンタン生成物の収率。

【図11】凍結乾燥された酵素調製物の無細胞活性試験および異なる反応 p H から得られた 5 - ヒドロキシ - ジクロフェナク生成物および 4 ' - ヒドロキシ - ジクロフェナク生成物の収率。

【図12】発現ベクター p D 4 5 4 - S R : 2 4 2 3 7 0。

【図13】発現ベクター p 3 C . 1 - A l u C 0 9 - A l u F 0 3。

【図14】発現ベクター p H D 0 2 - A l u C 0 9 - A l u F 0 3。

【図15】発現ベクター p 3 C - A l u C 0 9。

【図16】発現ベクター p C a m A B n。

【図17】発現ベクター p E T 2 9 a - P d R - P d X。

【図18】発現ベクター p H D 0 2 - A l u C 0 9 - P d R - P d X。

【図19】発現ベクター p E T 2 1 a - B M 3。

【図20】発現ベクター p E T 2 1 a - A l u C 0 9 _ B M 3。

【発明を実施するための形態】

【0 0 1 7】

本発明の第一の態様は、有機化合物をヒドロキシ化するための、配列番号 3 を含むシト

10

20

30

40

50

クロムP-450酵素、または配列番号3と少なくとも70%の同一性を有し且つCYP-450活性を有する変異型酵素の使用を提供する。

【0018】

具体的には、本発明はシトクロムP-450_{aluc09}酵素の使用を提供する。この酵素は配列番号3に示されるアミノ酸配列を有する。

【0019】

前記酵素は、農業研究局微生物株保存機関(ARS Culture Collection)、国立農業利用研究センター(National Center for Agricultural Utilization Research)(1815 North University Street, Peoria, Illinois 61604, USA)に受託番号N R R L 2 4 3 0で寄託されたアミコラトプシス・ルリダ菌株に存在する。この菌株はアメリカ培養細胞系統保存機関(American Tissue Culture Collection)にも受託番号A T C C 1 4 9 3 0で寄託されている。10

【0020】

この酵素、またはその変異型は、好適な還元酵素成分と組み合わされた場合、有機化合物をヒドロキシ化することができる。

【0021】

当業者によって理解されるように、前記シトクロムP-450_{aluc09}酵素は、公知のアミコラトプシス・ルリダ(N R R L - 2 4 3 0)から、または他の菌種から、精製有りまたは無しで抽出することができ、あるいは、シトクロムP-450_{aluc09}を大腸菌(E.coli)などの発現系にクローニングすることによって、組換え発現系から、精製有りまたは無しで同様に抽出することができる。20

【0022】

アミコラトプシス・ルリダ(N R R L - 2 4 3 0)を含む放線菌類は、自然要因から、さらには、紫外線照射、放射線治療および化学的治療等の人為的な処置の結果としても、変異を起こし易い。本発明は、アミコラトプシス・ルリダ(N R R L - 2 4 3 0)の全ての増殖性変異体を包含する。また、これらの変異株には、遺伝子組換え、形質導入および形質転換等の遺伝子操作によって得られるあらゆる菌株が包含される。また、周知の通り、放線菌類の特性は、同じ菌株であっても、連続的な培養後にある程度変化する。従って、培養物の特性には僅かな差異があるため、菌株同士は必ずしも分類学的に区別可能でなくてよい。本発明は、前記シトクロムP-450酵素のうちの1または複数を産生できる全ての菌株、および、特に、N R R L - 2 4 3 0菌株またはその変異株と明確に区別できない菌株を包含する。30

【0023】

本明細書に例示される特定のアミノ酸配列の変異型が本発明に包含されてもよいことは、当業者には明らかである。1または複数のアミノ酸残基が任意の組み合わせで置換、欠失または付加された、本明細書に開示されるアミノ酸配列のそれに類似したアミノ酸配列を有する変異型が特に好ましい。中でも、本発明のタンパク質の特性と活性を変化させないサイレント置換、サイレント付加およびサイレント欠失が好ましい。類似の特性を有する多様なアミノ酸が存在するが、ある物質の1または複数のそのようなアミノ酸は、その物質の所望の活性を除去することなく、1または複数の他のアミノ酸で置換できる場合が多い。すなわち、アミノ酸のグリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンはしばしば、互いに置換可能である(脂肪族側鎖を有するアミノ酸)。これらの可能な置換の中でも、グリシンおよびアラニンを用いて互いに置換することが好ましく(これらは比較的短い側鎖を有しているため)、また、バリン、ロイシンおよびイソロイシンを用いて互いに置換することが好ましい(これらは疎水性の巨大な脂肪族側鎖を有するため)。互いに置換できる場合が多い他のアミノ酸としては、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファン(芳香族側鎖を有するアミノ酸);リジン、アルギニンおよびヒスチジン(塩基性側鎖を有するアミノ酸);アスパラギン酸およびグルタミン酸(酸性側鎖を有するアミノ酸);アスパラギンおよびグルタミン(アミド側鎖を有するアミノ酸);並びに、システインおよびメチオニン(含硫側鎖を有するアミノ酸)が挙げられる。変異型には40

自然発生的な変異型と人工的な変異型とが包含される。人工的な変異型は、核酸分子、細胞または生物に適用されるものを含む突然変異誘発法を用いて生成することができる。前記変異型は、本明細書に例示されるアミノ酸配列と実質的同一性を有することが好ましい。本明細書で使用される場合、用語「変異型」または「その変異体」とは、配列番号3と、「実質的同一性」を有するアミノ酸配列を指し、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも98.1%、少なくとも98.2%、少なくとも98.3%、少なくとも98.4%、少なくとも98.5%、少なくとも98.6%、少なくとも98.7%、少なくとも98.8%、少なくとも98.9%、少なくとも99%、少なくとも99.1%、少なくとも99.2%、少なくとも99.3%、少なくとも99.4%、少なくとも99.5%、少なくとも99.6%、少なくとも99.7%、少なくとも99.8%または少なくとも99.9%の同一性を有するアミノ酸配列が好ましい。「実質的同一性」という用語は、望ましくは、前記配列が、従来技術のアミノ酸配列とよりも、本明細書に記載される配列のいずれかと、より大きな程度の同一性を有することを示す。アミノ酸配列を比較するために、CLUSTALプログラム等のプログラムを利用することができる。このプログラムは、アミノ酸配列同士を比較するものであり、必要に応じていずれかの配列にスペースを挿入することで最適なアラインメントを見つける。最適アラインメントを目的として、アミノ酸の同一性または類似性（アミノ酸種類の同一性および保存）を算出することができる。BLASTxのようなプログラムは、類似配列が最長となるようにアラインメントを行い、その一致に対して値を割り当てる。すなわち、類似領域がいくつか存在し、それぞれが異なるスコアを有する場合も、比較を行うことができる。上記は本出願で開示される全てのアミノ酸配列に準用される。

【0024】

好ましい実施形態において、用語「変異型」または「その変異体」は、通常、配列番号3と少なくとも70%の同一性を有し且つCYP450活性を有する配列を指し、配列番号3と少なくとも90%の同一性または配列番号3と少なくとも95%の同一性を有することがより好ましく、配列番号3と96%の同一性を有することがさらに好ましく、配列番号3と97%の同一性を有することがさらに好ましく、配列番号3と100%の同一性を有することが最も好ましい。

【0025】

特許請求の範囲に記載されたシトクロムP-450酵素を用いて様々な化合物をヒドロキシ化することができる。好ましい実施形態では、本明細書の実施例7に記載されるものと同じ条件を用いて、ヒドロキシ化される有機化合物は少なくとも3%のヒドロキシ化された誘導体への変換率を有し、より好ましくは少なくとも5%、より好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも25%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも70%、最も好ましくは100%のヒドロキシ化された誘導体への変換率を有する。

【0026】

前記ヒドロキシ化される有機化合物はエポチロンではないことが好ましい。

【0027】

前記シトクロムP-450酵素によりヒドロキシ化される化合物は、置換されていてもよいイソプロピルまたはtert-ブチル等の分岐アルキル基を有して、それがヒドロキシ化されてもよいし；あるいは、置換されていてもよいアリールまたはヘテロアリール等の芳香族基を有して、それがヒドロキシ化されてもよい。

【0028】

これらの化合物からヒドロキシ化された誘導体への変換率は、特許請求の範囲に記載されたシトクロムP-450酵素を使用した場合に特に高くなる。

【0029】

ヒドロキシ化される化合物は式(Ia)または式(Ib)の化合物であることが好まし

10

20

30

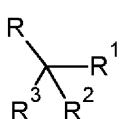
40

50

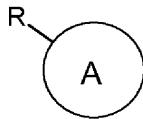
い。

【0030】

【化1】



(Ia)



(Ib)

式中、Rは化合物の残りの部分を表す。R¹、R²およびR³は独立してHまたはC₁ - C₂アルキルまたはC₆ - C₁₀アリールから選択され、あるいは、R¹、R²およびR³のうちいずれか2つが互いに結合して、置換されていてもよいシクロアルキルまたはヘテロシクロアルキルを形成していてもよく、あるいは、R¹、R²およびR³が互いの架橋炭素と結合してオレフィン、アリールまたはヘテロアリールを形成していてもよい。Aは置換されていてもよいベンジル、アリールまたはヘテロアリールである。

【0031】

Rは置換されていてもよいアルキル；置換されていてもよいオレフィン、置換されていてもよいアリール、置換されていてもよいヘテロアリールまたは置換されていてもよいヘテロシクロアルキルであることが好ましい。

【0032】

Aは、1または複数のハロゲン原子、C₁ ~ C₈アルキル基、C₁ ~ C₈アルコキシ基、-COOH基、C₁ ~ C₈-COOH基、シアノ基、アミノ基またはアルキルアミノ基で置換されていてもよいベンジル、アリールまたはヘテロアリールであることが好ましい。

【0033】

Aは、1または複数のハロゲン原子、C₁ ~ C₄アルキル基、-COOH基またはC₁ ~ C₄アルキル-COOH基で置換されていてもよいベンジル、アリールまたはヘテロアリールであることがより好ましい。

【0034】

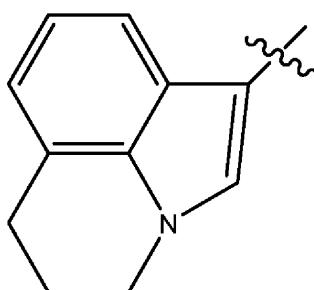
Aは、C₁ ~ C₈アルキル基、C₁ ~ C₈アルコキシ基、-COOH基、C₁ ~ C₈-COOH基、シアノ基、アミノ基またはアルキルアミノ基で置換されていてもよいC₆アリールまたはC₄ ~ C₂₀の二環式もしくは三環式のヘテロアリールであることがより好ましい。

【0035】

Aは、インドリル、イソインドリル(isindolyl)、アザインドリルまたは下記式を有する基であることが最も好ましい。

【0036】

【化2】



【0037】

本明細書で使用される場合、「アルキル」は、C₁ ~ C₁₀のアルキル基を意味し、直鎖状であっても分岐鎖状であっても環式であってもよい。例としてプロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルが挙げられる。C₃ ~ C₁₀のア

10

20

30

40

50

ルキル部分であることが好ましい。C₅～C₆のアルキル部分であることがより好ましい。前記アルキルは置換されていてもよいシクロヘキシリルであることが好ましい。

【0038】

本明細書で使用される場合、「アルコキシ」は、上記で定義されたようなアルキル基に酸素原子が結合したものを意味する。

【0039】

本明細書で使用される場合、「ハロゲン」とはフッ素、塩素、臭素およびヨウ素を指す。

【0040】

本明細書で使用される場合、用語「アルキルアミノ」とは、本明細書で定義されたような少なくとも1つのアルキル基が、アミノ基を介して親分子部分に付加されていることを意味する。好適なアルキルアミノ基の例として、メチルアミノ(methylamino)、エチルアミノ(ethylamino)、プロピルアミノ(propylamino)、ブチルアミノおよびヘキシリルアミ

ノが挙げられるが、これらに限定はされない。

【0041】

用語「アルケニル」とは、少なくとも1つの炭素炭素二重結合と、1～10個の炭素原子とを含有する直鎖状または分岐状の炭化水素鎖を意味する。

【0042】

明確にするために記すと、シクロアルキルという用語は環状アルキル基のことである。

【0043】

本明細書で使用される場合、「アリール」とは、フェニル、ビフェニル、ナフチル(naphthyl)、アントラセニル等の置換されていてもよい单環式、二環式または三環式の芳香族ラジカルを意味する。前記アリールは置換されていてもよいC₆アリールであることが好ましい。

【0044】

本明細書で使用される場合、「ヘテロアリール」とは、酸素、窒素および硫黄から選択される1～4個のヘテロ原子を含有する置換されていてもよい单環式、二環式または三環式の芳香族ラジカルを意味し、例えば、フラニル、ピロリル、チアゾリル、イソチアゾリル、テトラゾリル、イミダゾリル、オキサゾリル、イソオキサゾリル、チエニル、ピラゾリル、ピリジニル、ピラジニル、ピリミジニル、インドリル、アザインドリル、イソインドリル、キノリル、イソキノリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、オキサジアゾリルが挙げられる。前記ヘテロアリールは置換されていてもよいチオアゾールであることが好ましい。

【0045】

本明細書で使用される場合、ヘテロシクロアルキルとは、1～4個の炭素原子がヘテロ原子で置換されている、置換されていてもよいシクロアルキルを意味する。前記ヘテロ原子は窒素、酸素、硫黄または亜リン酸(phosphorous)から選択されることが好ましい。

【0046】

本明細書で使用される場合、用語「置換されていてもよい」とは、Hが化合物から除去されており、炭素、水素、窒素、酸素および硫黄を任意に組み合わせて構成されるもの等の有機断片と置換されていることを意味する。

【0047】

前記式(I)の化合物は50～2000の分子量を有することが好ましく、例えば100～700の分子量が挙げられ、200～500の分子量を有することがより好ましい。

【0048】

R¹、R²およびR³のうちの少なくとも2つはC₁～C₁₂アルキルまたはC₆～C₁₀アリールから選択されることが好ましい。R¹、R²およびR³は独立してH、C₁～C₆アルキルまたはC₆～C₁₀アリールから選択されることが好ましいが、ただし、R¹、R²およびR³のうち1つだけがHである、またはどれもHでないことが好ましい。R¹、R²およびR³は独立してH、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、ペンチル

10

20

30

40

50

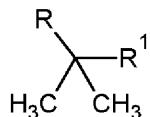
およびヘキシルから選択されることが最も好ましいが、ただし、R¹、R²およびR³のうち1つだけがHである、またはどれもHでないことが好ましい。

【0049】

特に好ましい実施形態では、ヒドロキシ化される化合物は式(II)の化合物であり、

【0050】

【化3】



10

(II)

式中、Rは化合物の残りの部分を表し、R¹はCH₃またはHである。

【0051】

この場合、前記シトクロムP-450酵素は以下の反応を触媒する。

【0052】

【化4】



20

式中、R¹ = H, CH₃

【0053】

すなわち、特に好ましい実施形態では、前記有機化合物はイソプロピル基またはtert-ブチル基を含む。ヒドロキシ化される基がtert-ブチル部分であることが最も好ましい。前記シトクロムP-450酵素が、tert-ブチル部分を有する基質化合物のヒドロキシ化tert-ブチル誘導体への変換を触媒する。

【0054】

特に好ましい実施形態では、前記シトクロムP-450酵素はボセンタン、ジクロフェナク、ブバルバコン、チバンチニブ、BIRB796またはリトナビル等の化合物と反応する。前記シトクロムP-450酵素はボセンタン、ブバルバコン、BIRB796またはリトナビルと反応することが最も好ましい。

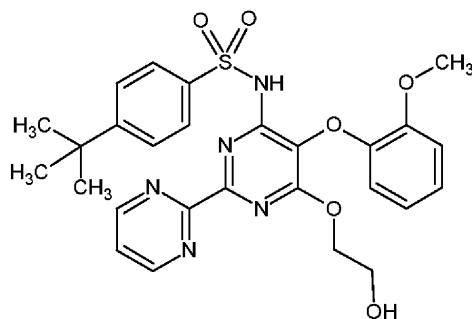
30

【0055】

式(I)の化合物は通常、以下の構造式の化合物である。

【0056】

【化5】

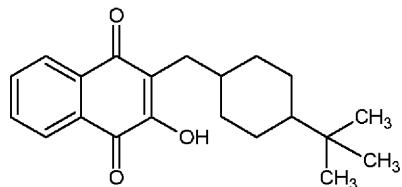


40

【0057】

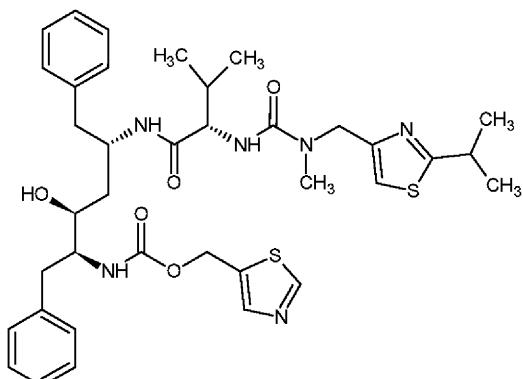
50

【化 6】



【0058】

【化 7】

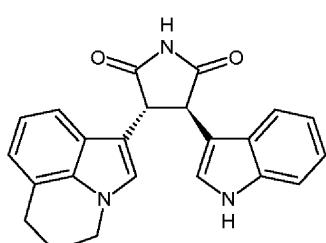


10

20

【0059】

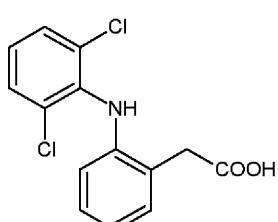
【化 8】



30

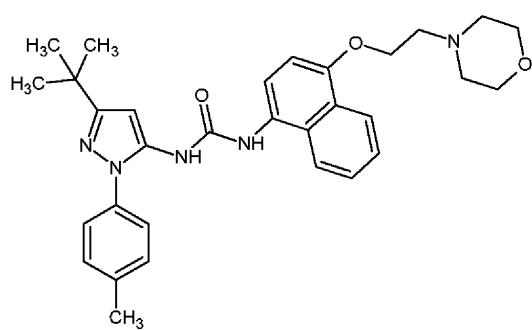
【0060】

【化 9】



【0061】

【化 10】



40

50

【 0 0 6 2 】

前記シトクロム P - 450 酵素は、前記シトクロム P - 450 を活性化する還元酵素成分と組み合わせて使用されてもよい。好ましい実施形態では、フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素成分が使用される。シトクロム P - 450 を活性化するものであればいかなる成分が用いられてもよく、例えば、直接的もしくは間接的に作用する小分子化学物質、溶液状のタンパク質化学物質、または直接的にもしくはペプチド結合で融合したものの、または、電極を介した電気的なもの、が挙げられる。特に好ましい実施形態では、前記配列番号 3 を有するシトクロム P - 450 a l u C 09 酵素、または配列番号 3 と少なくとも 70 % の同一性を有し且つ C Y P - 450 活性を有する変異型酵素を、好適なフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素成分と組み合わせることで、基質化合物をヒドロキシ化された誘導体に変換するのに効果的な系が得られる。

10

【 0 0 6 3 】

好ましい実施形態では、前記シトクロム P - 450 酵素またはその変異型はアミコラトブシス・ルリダ (N R R L - 2430) 細胞に存在する。

【 0 0 6 4 】

別の好ましい実施形態では、前記シトクロム P - 450 酵素またはその変異型は、アミコラトブシス・ルリダ (N R R L 2430) に由来する、前記酵素をコードする異種核酸を含む少なくとも 1 種の組み換え微生物によって発現される。本明細書で使用される場合、用語「含む」は、特許請求の範囲に記載された配列を少なくとも含有することを意味することを意図したものであるが、他の配列を含んでもよい。一実施形態において、前記組み換え微生物は前記酵素またはその変異型をコードする異種核酸を含む。別の実施形態では、前記組み換え微生物は還元酵素剤をコードする異種核酸も含む。

20

【 0 0 6 5 】

本発明の別の態様において、有機化合物と、配列番号 3 を含むシトクロム P - 450 酵素、または配列番号 3 と少なくとも 70 % の同一性を有し且つ C Y P - 450 活性を有する変異型酵素とを反応させることを含む、ヒドロキシ化された有機化合物の生産法が提供される。

【 0 0 6 6 】

ヒドロキシ化される化合物の選択に関しては上記の通りである。

30

【 0 0 6 7 】

好ましい実施形態では、前記酵素はプロピル基またはブチル基のヒドロキシ化を触媒するために使用され、より好ましくはイソプロピル基またはイソブチル基または t e r t - ブチル基のヒドロキシ化を触媒するために使用される。最も好ましくは、前記酵素は t e r t - ブチル部分のヒドロキシ化を触媒するために使用される。前記シトクロム P - 450 酵素は t e r t - ブチル部分を有する基質化合物の、ヒドロキシ化された - t e r t - ブチル誘導体への変換を触媒することができる。

【 0 0 6 8 】

特に好ましい実施形態では、前記ヒドロキシ化される化合物はボセンタン、ジクロフェナク、チバンチニブ、ブバルバコン、B I R B 796 またはリトナビルである。前記ヒドロキシ化される化合物はボセンタン、ブバルバコン、B I R B 796 またはリトナビルであることが最も好ましい。

40

【 0 0 6 9 】

前記シトクロム P - 450 酵素を活性化するために、1 または複数の追加成分が使用されてもよい。本発明による実施形態では、前記シトクロム P - 450 酵素は還元酵素成分と組み合わされて使用され、好ましくはフェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素成分と組み合わされて使用される。

【 0 0 7 0 】

本発明の好ましい実施形態では、前記シトクロム P - 450 酵素またはその変異型はアミコラトブシス・ルリダ (N R R L - 2430) 細胞に存在する。前記細胞はヒドロキシ化される有機化合物を投与される場合がある。この方法は、前記細胞をその後回収し精製

50

することでヒドロキシ化された化合物を得る追加の工程を含んでもよい。

【0071】

P - 450 酵素抽出物を生産するためのアミコラトプシス・ルリダ (N R R L - 2430) の培養は、係る微生物との共に使用されることがよく知られている栄養分を含有する従来培地の播種によって、好適に行われる。すなわち、前記培地は同化できる炭素の供給源および同化できる窒素の供給源を含有する。前記培地は無機塩類を含有していてもよい。同化できる炭素の供給源の例としては、グルコース、スクロース、デンプン、グリセリン、水飴、糖蜜およびダイズ油が挙げられる。同化できる窒素の供給源の例としては、ダイズ固形分 (大豆ミールまたは大豆粉等)、コムギ胚芽、肉エキス、ペプトン、コーンスティーブリカーや乾燥酵母、および硫酸アンモニウム等のアンモニウム塩類が挙げられる。必要であれば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、炭酸カルシウムおよび各種リン酸塩類等の無機塩類が含まれてもよい。前記培地は、滅菌され、5 ~ 8 に調整された pH を有することが好ましい。

【0072】

当業者には理解されることであるが、特定の培養法の使用は本発明にとって重大な意味を持つわけではなく、また、放線菌の培養に一般に使用されるいかなる方法も本発明に等しく採用され得る。通常、採用される方法は産業的な効率を考慮して選ばれる。すなわち、産業的な観点からは、液体培養が通常好ましく、液内培養が最も好都合である。培養は好気条件下で行われることが好ましい。

【0073】

本発明の酵素は誘導酵素であり、誘導剤が存在しない限りは生産されない。この誘導剤は、単離された酵素の目的基質と同じとなるように選択されることが好ましいが、それに限定はされない。播種後 4 時間から 3 日間経過してから、好ましくは 0.05 ~ 5 mM、より好ましくは 0.2 mM の誘導剤を添加し、その後、2 時間から 1 週間、好ましくは約 1 日間、培養を継続する。培養温度は通常は 20 ~ 45 、好ましくは 25 ~ 30 であり、最適は約 27 である。振盪培養またはエアレーション法を用いることができる。

【0074】

前記培養により得られた細胞は、緩衝溶液中での高圧ホモジナイズ法等の細胞破壊法によって破壊される場合がある。遠心分離により得られた上清から粗酵素溶液が得られる。例えば、本発明の酵素は、38,000 × g で 20 分間の遠心分離により生じた上清中に得ることができる。

【0075】

別の実施形態では、前記シトクロム P - 450 酵素またはその変異型は、アミコラトプシス・ルリダ (N R R L 2430) に由来する、前記酵素をコードする異種核酸を含む少なくとも 1 種の組み換え微生物によって発現される。

【0076】

ここで、前記少なくとも 1 種の組み換え微生物には、ヒドロキシ化される有機化合物を投与することができる。この方法はヒドロキシ化された化合物を得るための精製工程を含んでもよい。

【0077】

好ましい実施形態において、これは、インタクトなヘムを有する機能的なシトクロム P - 450 a1 u C 09 タンパク質の組換え発現によって達成できる。これは、補因子酵素のうちのいずれかまたは全てと発現できる。特に好ましい実施形態では、フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素が発現され得る。これは、多シストロン性プラスミドの使用によって又は融合タンパク質を介して、リンカーを介して又は直接的に、単一のタンパク質産物へと、達成できる。

【0078】

あるいは、前記機能的なシトクロム P - 450 a1 u C 09 タンパク質は、補因子酵素と混合させずに、単独で発現される場合がある。好ましい実施形態では、補因子酵素は、物質生産後に活性がある酵素反応を与えるように用量設定され得る。前記補因子は、野生

10

20

30

40

50

型または組換え型の、植物由来または微生物発酵由来の物質からの抽出によって得てもよい。Hussain & Ward., Appl Environ Microbiol. 2003; 69(1):373-382には使用され得る

クローニング法が記載されている。

【0079】

組換え酵素または抽出酵素を発現する天然生物、宿主菌株は、一相性、二相性または三相性の水性媒体中で基質と直接接触していることが好ましく、係る多相系は分散形態か層状形態である。pHおよび温度の選択をはじめとする反応条件は当業者には明らかであり、従来技術に基づくものである。例えば、pH値が5～12の範囲内、より好ましくは6.5～11.0の範囲内、最も好ましくは約7.4の、微生物増殖培地またはリン酸緩衝液を選択して使用してよい。特に注目すべきは、高いpH値（例えばpH値11）におけるこの組換え酵素の活性である。そのようなpHでも反応を触媒可能であることは、カルボキシル部分を有する化合物等の、pHが高くなるほど溶解性が向上する選択された基質について、基質添加量を増加させることができるために、特別な商業的利点をもたらす。より高いpHにおける触媒作用の他の利点は、化学合成、原料の塩基触媒加水分解、またはpH上昇を利用して反応が停止された別の酵素による反応産物等、生成物をもたらした前の工程から係る生成物をそのまま利用することができる。反応温度は好ましくは10～45の範囲内、より好ましくは25～30の範囲内である。反応媒体中の基質の濃度は0.01重量%～5.0重量%の範囲内であることが好ましい。前記反応に許容される時間は、反応混合物中の基質濃度、反応温度、および他の要因に応じて変動し得るが、通常は1分間～5日間であり、さらには、1時間～16時間である場合が多い。抽出された酵素物質は、抽出後にそのまま使用されることもあるし、凍結溶液中で保存後に使用されることもある。特に好ましい実施形態では、前記抽出された酵素物質は、後の使用のために、他の酵素補因子成分等の、反応に必要な他の成分を添加して又は添加せずに、好ましくは凍結乾燥によって、乾燥されることがある。

【0080】

変換反応の完了後、ヒドロキシ化された化合物は従来の方法を用いて単離することができ、例えば、濾過、溶媒抽出、クロマトグラフィー、結晶化、および他の単離法が挙げられる。そのような方法は、生成物の固有性を考慮に入れて選択されることになる。単離前、単離中、または単離後に、必要に応じて、生成物は誘導体化されてもよいし、誘導体化されなくてもよい。

【0081】

前記酵素の基質としての出発物質は、合成経路由来であってもよいし、天然であってもよく、植物性材料等の天然バイオマスを介したものでも、発酵によって生成されてもよく、またはその混合経路によるものでもよい。酵素反応は、純粋な材料を用いて行うことができるし、精製されていない材料を用いて行うこともでき、得られた反応物は後の反応成分または未反応成分の精製を促すために用いてよい。

【0082】

出発物質として使用される基質化合物のうち、トシリ酸塩または塩酸塩類等の、有機性または無機性の、遊離塩基類、アルカリ金属塩類、例えばナトリウム塩類またはカリウム塩類、または酸性塩類が、使用に適している。

【0083】

変換反応の完了後、所望の化合物が、前記反応系から生成され、収集され、単離され、必要であれば常法により精製されるか、以降の工程で未精製形態でそのまま使用され得る。例えば、前記反応産物は遠心分離または濾過され、上清または濾液が疎水性樹脂、イオン交換樹脂または酢酸エチル等の水非混和性有機溶剤で抽出される。前記抽出物の溶媒の蒸発後、残りの粗ヒドロキシ化化合物、例えば残りの粗ヒドロキシ化tert-ブチル化合物は、シリカゲルもしくはアルミナまたは逆相固定相を用いるカラムクロマトグラフィにかけ、好適な溶離液で溶離させることによって、精製され得る。出発物質が混合物である場合、生成物はヒドロキシ化された化合物の混合物として単離され、所望により、クロ

10

20

30

40

50

マトグラフィーまたは他の好適な方法を用いて分離され得る。

【0084】

通常、前記ヒドロキシ化された化合物は、生理活性力価等の医薬品もしくは農薬としての特性が向上したり、溶解性が向上したり、非特異的な相互作用が低減したり、以降の合成用等、単純にさらに有用であったり、分析用標準として有用となり得る。上記の式(I)および式(II)のヒドロキシ化された化合物が特に好ましい。

【0085】

構造が著しく異なる2種類の基質、すなわち、ボセンタン等の芳香族tert-ブチル化合物、およびブバルバコン等のtert-ブチルが芳香族炭素環系に直接結合していない化合物、を参照しながら、本発明をさらに説明する。

【0086】

本発明のシトクロムP-450酵素調製物を、基質としてのボセンタンと、pH7.4で5分間、(a)フェレドキシン、(b)フェレドキシン-NADP⁺-還元酵素、(c)NADP⁺、(d)NADPH再生系、および(e)溶存酸素と共に、反応させる場合、反応温度は少なくとも4から60までの範囲にある。各シトクロムに最適なpHは6.5~11.0の範囲にある。4、pH7.4に24時間保持された場合、各シトクロムは安定である。

【0087】

フェレドキシン、フェレドキシン-NADP⁺-還元酵素、酸素およびNADPHの使用は必須ではない。シトクロムP-450を活性化できるものであればいかなる成分を用いてもよい。

【0088】

酵素活性の測定は通常、2つの方法のうちの一方を用いて実行される。

【0089】

(i) シトクロムP-450_{aluc09}に関する測定

Omura and Sato et al. (J Biol Chem, 239, 1964, 2370)の方法に従って測定を行う。すなわち、下記式を用いて、450nmおよび490nmにおける差スペクトルの減少に対する、還元されたCOの吸光度差に基づいて、シトクロムP-450_{aluc09}が定量分析される。

【0090】

【数1】

$$\text{シトクロム P450 (mM)} = \frac{\text{吸光度(Abs)(450nm)} - \text{吸光度(Abs)(490nm)}}{91 \text{ (mM cm}^{-1}) \times l \text{ (cm)}}$$

【0091】

(ii) ボセンタンからヒドロキシ-ボセンタンの形成率測定。

以下の成分の混合物を用いる。

リン酸カリウム緩衝液(pH7.4) 50mM

MgCl₂ 5mM

発現されたフェレドキシン、フェレドキシン還元酵素、P450を含有する酵素溶液 シトクロムP450濃度において2.4μM

NADP⁺ 1mM

グルコース-6-リン酸 5mM

グルコース-6-リン酸脱水素酵素 2UN/mL

ボセンタン基質 0.1mg/mL

総体積 0.50mL

【0092】

酵素活性の測定のために、上記表の成分を混合し、その溶液を30で16~20時間振盪した後、500μlのアセトニトリルを添加して反応を止める。この酵素系により形

10

20

30

40

50

成されたヒドロキシ - ボセンタンの量を、HPLC または UPLC で確認する。

【0093】

活性を測定するための試験法を用いて、温度および pH の変化に伴う活性の低下を確認することができる。

【0094】

例えば、前記シトクロムは、20% グリセロールおよび 2 mM ジチオスレイトールの存在下、pH 7.4、70 に 60 分置くと完全に不活性化される。前記シトクロムは pH 3 またはより酸性側の pH で不活性化される。

【0095】

さらなる態様において、本発明は、i) 配列番号 3 を含むシトクロム P-450 酵素、もしくは配列番号 3 と少なくとも 70% の同一性を有し且つ CYP-450 活性を有する変異型酵素、または、ii) 配列番号 3 を含むシトクロム P-450 酵素、もしくは配列番号 3 と少なくとも 70% の同一性を有し且つ CYP-450 活性を有する変異型酵素を発現する微生物を含み、且つ、有機化合物をヒドロキシ化するための使用説明書をさらに含む、キットを提供する。

【0096】

前記キットにより使用者は目的化合物のヒドロキシ化のスクリーニング検査が可能となる。

【0097】

好ましい実施形態では、前記キットは電子供与剤をさらに含む。前記キットは、電子供与剤としてフェレドキシン還元酵素およびフェレドキシンを、補因子である NADH もしくは NADPH、または NAD+ もしくは NADP+、グルコースもしくはグルコース - 6 - リン酸、およびグルコース脱水素酵素もしくはグルコース - 6 - リン酸脱水素酵素等の補因子再生系と共に含むことが好ましい場合がある。しかし、好適であればいかなる電子供与剤も用いてよい。

【0098】

前記キットは、別個に又は他の構成要素に含まれて、緩衝液をさらに含んでもよい。

【0099】

前記キットは、1 または複数の他のシトクロム P-450 酵素をさらに含むことが好ましい場合がある。前記シトクロム P-450 酵素または微生物は、凍結乾燥されるか、または、他の高分子、もしくはアルギン酸ビーズ、ニッケルカラムおよび電気化学電極等の支持材に固定化もしくは係留されることが好ましい。

【0100】

以下の実施例で本発明の方法を説明する。これらの実施例は例示としてのみ与えられたものであって、本発明を限定するものと解釈されるべきではない。

【実施例】

【0101】

実施例 1：アミコラトプシス・ルリダ (N R R L - 2 4 3 0) 発酵を用いたヒドロキシ - ボセンタンの生産

5 g / L のグリセロール、20 g / L のグルコース、5 g / L の酵母エキスペプトン、2 g / L の肉エキス、5 g / L の真菌用ペプトン、1 g / L の二塩基性リン酸アンモニウム、3 g / L の塩化ナトリウム、0.3 g / L の硫酸マグネシウム・七水化物および 3.5 g / L の炭酸カルシウムを含有する培地を調製し、pH 7.0 に調整した。12 個の 250 mL 体積の三角フラスコに、この培地をそれぞれ 50 mL 含ませ、115 度 15 分間滅菌した。アミコラトプシス・ルリダ (N R R L - 2 4 3 0) を、液体窒素中に保存されたクライオバイアル内ストックから戻して、50 mL の上記増殖培地を含む 2 個のフラスコ内に播種した。27、200 rpm で、2 日間増殖させた後、そのシード培養物 (2% v/v) を用いて、50 mL の上記増殖培地をそれぞれ含む 10 個の 250 mL 三角フラスコに播種した。培養物を 27、200 rpm で 24 時間発酵させた後、52.7 mg のボセンタンを 1.05 mL の DMSO に溶解させて、その溶液を 100 μL ずつ各

10

20

30

40

50

フラスコに加え、ボセンタンの最終濃度を 100 mg / L とした。培養物を 27 、 200 rpm でインキュベートした。27 時間後、10 個全てのフラスコの内容物を合わせ、500 mL の酢酸エチルで 2 回抽出し、得られた抽出物を集めて乾燥させることで、189.3 mg の粗抽出物を得た。

【 0102 】

この抽出物を 2 mL の DMSO : MeOH (3 : 1) に溶解させ、分取 HPLC で次の通りに精製した。ウォーターズ社製 (Waters) Symmetry Shield RP 8 カラム (19 × 100 mm) 、流速 1.7 mL / 分、以下の勾配を用いて溶出。勾配は、まず 90 / 5 / 5 (H₂O / MeCN / 2% ギ酸水溶液) を 1 分間維持し、1 分間で 80 / 15 / 5 に増加し、23.9 分かけてゆっくりと 55 / 40 / 5 に増加し、1 分間かけて 0 / 95 / 5 にさらに増加し (t = 26 分) 、さらに 2 分間維持し、1 分間かけて開始条件に戻し、さらに 5 分間再平衡化して、これを繰り返す。19 分 ~ 20.5 分に溶出された標的産物を乾燥させたところ、LC - UV による 95% 超の純度を有する、25.2 mg のヒドロキシ化されたボセンタン産物が得られた。

【 0103 】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6): 11.31 (1H, s), 9.09 (2H, d, 4.9 Hz), 8.30 (2H, d, 8.2), 7.67 (1H, t, 4.8), 7.53 (2H, d, 8.4), 7.09 (1H, d, 8.1), 7.04 (1H, t, 7.6), 6.81, (1H, t, 7.6), 6.71 (1H, d, 8.0), 4.71 (1H, t, 5.3), 4.67 (1H, t, 5.3), 4.33 (2H, t, 5.4), 3.80 (3H, s), 3.47 (2H, m), 3.42 (2H, d, 4.8), 1.21, 6H, s).

【 0104 】

実施例 2 : アミコラトブシス・ルリダ (NRRL - 2430) 発酵を用いたヒドロキシ - ブバルバコンの生産

5 g / L のグリセロール、20 g / L のグルコース、5 g / L の酵母エキスペプトン、2 g / L の肉エキス、5 g / L の真菌用ペプトン、1 g / L の二塩基性リン酸アンモニウム、3 g / L の塩化ナトリウム、0.3 g / L の硫酸マグネシウム・七水化物および 3.5 g / L の炭酸カルシウムを含有する培地を調製し、pH 7.0 に調整した。12 個の 250 mL 体積の三角フラスコに、この培地をそれぞれ 50 mL 含ませ、117 で 15 分間滅菌した。アミコラトブシス・ルリダ (NRRL - 2430) を、液体窒素中に保存されたクライオバイアル内ストックから戻して、50 mL の上記増殖培地を含む 2 個のフラスコ内に播種した。27 、 200 rpm で、2 日間増殖させた後、そのシード培養物 (2% v / v) を用いて、50 mL の上記増殖培地をそれぞれ含む 10 個の 250 mL 三角フラスコに播種した。培養物を 27 、 200 rpm で 24 時間発酵させた後、20% ヒドロキシプロピル - - シクロデキストリン中 1 mg / mL のブバルバコン (1 mL の DMSO 中の 52.6 mg のブバルバコンという原液の 50 分の 1 希釀により調製) を、フラスコ当たり 5 mL ずつ加えて、105 mg / L という濃度を得た。投与後の培養物の経時変化を追い、標的代謝産物であるヒドロキシ - ブバルバコンの生産を評価した。経時的解析に基づき、24 時間後に培養物を回収し抽出した。

【 0105 】

培養後、細胞を遠心分離で集めた。細胞塊を MeCN で抽出し、減圧下で乾固し、凍結乾燥した。上清を HPLC に吸着させ、水で洗浄し、MeCN で溶出した後、濃縮することで、以下に記載されるような精製の準備をした。

【 0106 】

精製：合わせた抽出物をウォーターズ社製 X - Select C18 カラム (19 × 100 mm) で分画し、流速 20 mL / 分で以下の勾配を用いて溶出した。勾配は、まず 95 / 5 (H₂O / MeCN (共に 0.1% ギ酸を含む)) を 2 分間維持し、0.2 分間で 50 / 50 に増加し、9.8 分間かけて 20 / 80 に増加し、0.2 分間かけて 2 / 98 に増加し、さらに 2.3 分間維持し、0.1 分間かけて開始条件に戻し、さらに 0.4 分間再平衡化した。8 分 ~ 8.6 分に溶出された標的を乾燥させたところ、LC - UV で 95% 超の純度を有する、14.0 mg のヒドロキシ化されたブバルバコン産物が得られた。

【 0107 】

10

20

30

40

50

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6): 7.96 (2H, t, 7.6 Hz), 7.81 (1H, td, 7.5, 1.4), 7.75 (1H, td, 7.5, 1.4), 4.31 (1H, t, 5.4), 3.11 (2H, d, 4.1), 2.36 (2H, d, 7.0), 1.68 (2H, m), 1.63 (2H, m), 1.46 (1H, m), 1.16 (1H, m), 0.90 (4H, m), 0.70 (6H, s)

【0108】

実施例3：アミコラトブシス・ルリダ（N R R L - 2 4 3 0）発酵を用いたヒドロキシ-リトナビルの生産

5 g / L のグリセロール、20 g / L のグルコース、5 g / L の酵母エキスペプトン、2 g / L の肉エキス、5 g / L の真菌用ペプトン、1 g / L の二塩基性リン酸アンモニウム、3 g / l の塩化ナトリウム、0.3 g / L の硫酸マグネシウム・七水化物および3.5 g / L の炭酸カルシウムを含有する培地を調製し、pH 7.0 に調整した。42個の250 mL 体積の三角フラスコに、この培地をそれぞれ50 mL 含ませ、115度で15分間滅菌した。アミコラトブシス・ルリダ（N R R L - 2 4 3 0）を、液体窒素中に保存されたクライオバイアル内ストックから戻して、50 mL の上記増殖培地を含む2個のフラスコ内に播種した。27、200 rpmで、2日間増殖させた後、そのシード培養物（2% v/v）を用いて、50 mL の上記増殖培地をそれぞれ含む40個の250 mL 三角フラスコに播種した。培養物を27、200 rpmで24時間発酵させた後、リトナビルを100 mg / L の濃度で投与した。リトナビルは、上記実施例2のパルバコンに関して記載されたように配合してから投与した。投与後の培養物の一日の経時変化を追い、標的産物であるヒドロキシ-リトナビルの生産を評価した。経時的解析に基づき、72時間後に培養物を回収し抽出した。

10

20

30

【0109】

培養後、細胞を遠心分離で集めた。細胞塊をMeCNで抽出し、減圧下で乾固し、凍結乾燥した。上清をHP20に吸着させ、水で洗浄し、MeCNで溶出させた。

【0110】

精製：合わせた抽出物を、ウォーターズ社製 Novapak C18カラム（40×100 mm）+ガードカラム（40×10 mm）で分画した。流速は50 mL / 分であり、勾配は、まず90/5/5%（H₂O / MeCN / 200 mM ギ酸アンモニウム + 2% ギ酸水溶液）を1.1分間維持し、17分間で45/50/5に増加し、1分間かけて0/95/5に再度増加し、4分間洗浄し、1分間かけて開始条件に戻し、4分間かけて再平衡化した。純粋でない標的ヒドロキシ-リトナビルが16.0分～17.5分に溶出した。

30

【0111】

標的生成物をウォーターズ社製 Symmetry Shield RP8カラム（19×100 mm）で精製し、流速17 mL / 分で以下の勾配を用いて溶出した。勾配は、まず90/5/5（H₂O / MeCN / 2% ギ酸含有MeCN）を1分間維持し、1分間で60/30/5に増加し、さらに20分間維持し、2分間かけて0/95/5に増加し、さらに2分間維持し、1分間かけて開始条件に戻し、さらに4分間再平衡化した。13分～14分に溶出された標的を乾燥させたところ、LC-UVで95%超の純度を有する、21.5 mg のヒドロキシ化されたリトナビル産物が得られた。

40

【0112】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6): 9.05 (1H, s), 7.85 (1H, s), 7.70 (1H, d, 8.4), 7.16 (14H, m), 6.87 (1H, d, 9.4), 6.01 (1H, d, 8.7), 5.91 (1H, s), 5.15 (2H, m), 4.62 (1H, d, 6.3), 4.42 (2H, s), 4.14 (1H, m), 3.92, 1H, dd, 8.7, 7.7), 3.82 (1H, q, 9.3), 3.58 (1H, q, 8.8), 2.86 (3H, s), 2.67 (2H, m), 2.62 (2H, m), 1.88 (1H, m), 1.49 (3H, s), 1.48 (3H, s), 1.45 (1H, m), 0.77 (1H, m), 0.74 (6H, d, 6.8).

40

【0113】

1.49 ppm および 1.48 ppm のイソプロピルメチルは、架橋しているメチン位におけるヒドロキシ化の後、一重線となる。

【0114】

実施例3a：アミコラトブシス・ルリダ（N R R L - 2 4 3 0）発酵を用いたヒドロキシ-

50

化されたチバンチニブ代謝産物の生産

5 g / L のグリセロール、20 g / L のグルコース、5 g / L の酵母エキスペプトン、2 g / L の肉エキス、5 g / L の真菌用ペプトン、1 g / L の二塩基性リン酸アンモニウム、3 g / l の塩化ナトリウム、0.3 g / L の硫酸マグネシウム・七水化物および3.5 g / L の炭酸カルシウムを含有する培地を調製し、pH 7.0 に調整した。40個の250 mL 体積の三角フラスコに、この培地をそれぞれ50 mL 含ませ、115度で15分間滅菌した。アミコラトブシス・ルリダ (N R R L - 2430) を、液体窒素中に保存されたクライオバイアル内ストックから戻して、50 mL の上記増殖培地を含む2個のフラスコ内に播種した。27、200 rpmで、2日間増殖させた後、そのシード培養物 (2% v / v) を用いて、50 mL の上記増殖培地をそれぞれ含む40個の250 mL 三角フラスコに播種した。培養物を27、200 rpmで24時間発酵させた後、チバンチニブをDMSOに溶解させ、各フラスコに加えて、チバンチニブの最終濃度を100 mg / L とした。培養物を27、200 rpmでインキュベートした。72時間後、40個全てのフラスコの内容物を合わせて遠心分離した。細胞塊をMeCN (1.5 L) で抽出し、回転蒸発で濃縮した。水性のプロス上清をHP20に吸着させ (500 mL) 、水で洗浄し、MeCN (1.5 L) で溶出し、回転蒸発で濃縮した。このHP20濃縮物と細胞抽出物濃縮物とを合わせ (500 mL) 、酢酸エチル (3 × 500 mL) で抽出した。合わせた酢酸エチル層を回転蒸発により乾固し、得られた物質をアセトニトリル - H₂O (9 : 1、500 mL) とヘキサン (500 mL)との間で分割した。ヘキサン層を廃棄し、アセトニトリル層を濃縮乾固した。この物質をウォーターズ社製NovaPak C18カラム (40 × 100 mm) + ガードカラム (40 × 10 mm) を用いた逆相HPLCで分画した。流速は50 mL / 分であり、勾配は、まず90 / 5 / 5% (H₂O / MeCN / 200 mM ギ酸アンモニウム + 2% ギ酸水溶液) を1.1分間維持し、次の10分間に15 / 80 / 5に直線的に増加させ、1分間かけて0 / 95 / 5に再度増加させ、2分間洗浄し、1分間かけて開始条件に戻し、5分間かけて再平衡化した。モノヒドロキシ化された代謝産物を含有する画分は6.5分～8.0分 (画分14～16) に溶出されていることが分かり、さらなる精製のためにこれらを濃縮乾固した。

【0115】

画分14をウォーターズ社製X-Slect C18カラム (19 × 100 mm) でさらに精製し、20 mL / 分の流速で以下の勾配を用いて溶出した。勾配は、まず95 / 5 (10 mM 炭酸水素アンモニウム水溶液 / MeCN) を2分間維持し、0.1分間で75 / 25に増加し、さらに14.9分間この組成で維持し、0.1分間かけて95 / 5に増加し、さらに1分間維持し、0.1分間かけて開始条件に戻し、さらに0.9分間再平衡化した。13分～14分に溶出するピークおよび14分～15分に溶出するピークを、別々に集め、濃縮乾固したところ、それぞれ19.0 mg の化合物と6.8 mg の化合物が得られ、NMRにより、チバンチニブ代謝産物であるM4とM5であると同定された (T. Murai et al. (2014) Metabolism and disposition of [¹⁴C]tivantinib after oral administration to humans, dogs and cats. Xenobiotica 44: 996-1008)。しかし、これら

の2種のエピマーを区別することはできなかった。

【0116】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6):

【0117】

第一代謝産物 : 11.45 (1H, bs), 11.03 (1H, d, 2.8 Hz), 7.41 (1H, d, 7.8 Hz), 7.38 (1H, d, 2.5 Hz), 7.36 (1H, d, 8.4 Hz), 7.36 (1H, s), 7.27 (1H, d, 8.0 Hz), 7.08 (1H, ddd, 8.2, 7.1, 1.1 Hz), 7.05 (1H, d, 7.1 Hz), 6.96 (1H, d, 8.0 Hz), 6.95 (1H, t, 7.7 Hz), 5.34 (1H, d, 5.4 Hz), 4.89 (1H, q, 5.1 Hz), 4.53 (1H, d, 7.0 Hz), 4.48 (1H, d, 7.0 Hz), 4.14 (2H, m), 2.11 (2H, m).

【0118】

第二代謝産物 : 11.51 (1H, bs), 11.02 (1H, d, 2.9 Hz), 7.41 (1H, d, 7.9 Hz), 7.

10

20

30

40

50

3.7 (1H, d, 2.7 Hz), 7.36 (1H, m), 7.35 (1H, s), 7.27 (1H, d, 8.2), 7.08 (1H, ddd, 8.1, 7.0, 1.1 Hz), 7.05 (1H, d, 7.1 Hz), 6.96 (1H, t, 7.8 Hz), 6.94 (1H, t, 8.0 Hz), 5.34 (1H, q, 5.3 Hz), 4.90 (1H, d, 5.2 Hz), 4.51 (1H, d, 6.9 Hz), 4.48 (1H, d, 7.0 Hz), 4.14 (2H, m), 2.11 (2H, m).

【0119】

画分15を、ウォーターズ社製Xbridgeフェニルカラム(19×100mm)を用い、20ml/分の流速で、以下の勾配で溶出することで、さらに精製した。95/5(0.1%アンモニア水/MeCN)から開始し、この組成を2.5分間維持し、次の7.5分間をかけて5/95に直線的に増加し、この組成をさらに0.9分間維持し、その後0.1分間かけて開始条件に戻し、さらに1.0分間再平衡化した。6.0分~6.5分に溶出するピークを集め、濃縮乾固することにより、NMR分光分析法で同定されたところの、6.6mgのチバンチニブ代謝産物M7が得られた(T. Murai et al. (2014) Metabolism and disposition of [¹⁴C]tivantinib after oral administration to humans, dogs and cats. Xenobiotica 44: 996-1008)。

10

【0120】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6): 11.38 (1H, bs), 10.61 (1H, d, 2.4 Hz), 8.93 (1H, bs), 7.31 (1H, s), 7.17 (1H, d, 7.5 Hz), 7.16 (1H, d, 8.5 Hz), 7.13 (1H, d, 2.1Hz), 6.88 (1H, t, 7.4 Hz), 6.84 (1H, d, 6.8 Hz), 6.71 (1H, d, 2.1 Hz), 6.49 (1H, dd, 8.5, 2.2 Hz), 4.44 (1H, d, 6.7 Hz), 4.35 (1H, d, 6.7 Hz), 4.10 (2H, dd, 6.6, 4.6 Hz), 2.90 (2H, t, 6.0 Hz), 2.10 (2H, dt, 11.1, 5.6 Hz).

20

【0121】

画分16を、ウォーターズ社製Xbridgeフェニルカラムを用い、20ml/分の流速で、以下の勾配で溶出することで、さらに精製した。勾配は、まず95/5(0.1%アンモニア水/MeCN)を2分間維持し、0.1分間で85/15に増加し、次の7.9分間をかけて75/25に直線的に増加し、0.1分間かけて95/5に増加し、さらに0.8分間維持し、0.1分間かけて開始条件に戻し、さらに1.0分間再平衡化した。5.7分~6.3分に溶出するピークを集め、濃縮乾固したところ、NMR分光分析法による同定によればチバンチニブ代謝産物M9であり得る、0.6mgの化合物が得られた(T. Murai et al. (2014) Metabolism and disposition of [¹⁴C]tivantinib after oral administration to humans, dogs and cats. Xenobiotica 44: 996-1008)。

30

【0122】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6): 11.06 (1H, d, 2.5 Hz), 7.32 (1H, s), 7.24 (1H d 2.6 Hz), 7.16 (1H, d, 7.8 Hz), 6.88 (1H, t, 7.4 Hz), 6.84 (1H, d, 7.2 Hz), 6.82 (1H, d, 8.0 Hz), 6.75 (1H, t, 7.7 Hz), 6.49 (1H, d, 7.4 Hz), 4.47 (1H, d, 6.8 Hz), 4.41 (1H, d, 6.8 Hz), 4.09 (2H, t, 5.7 Hz), 2.90 (2H, t, 6.0 Hz), 2.11 (2H, p, 5.6 Hz).

【0123】

実施例3b：アミコラトブシス・ルリダ(NRRL-2430)発酵を用いたヒドロキシ化されたジクロフェナク代謝産物の生産

5g/Lのグリセロール、20g/Lのグルコース、5g/Lの酵母エキスペプトン、2g/Lの肉エキス、5g/Lの真菌用ペプトン、1g/Lの二塩基性リン酸アンモニウム、3g/lの塩化ナトリウム、0.3g/Lの硫酸マグネシウム・七水化物および3.5g/Lの炭酸カルシウムを含有する培地を調製し、pH 7.0に調整した。20個の250ml体積の三角フラスコに、この培地をそれぞれ50ml含ませ、115℃で15分間滅菌した。アミコラトブシス・ルリダ(NRRL-2430)を、液体窒素中に保存されたクライオバイアル内ストックから戻して、50mlの上記増殖培地を含む2個のフラスコ内に播種した。27℃、200rpmで、2日間増殖させた後、そのシード培養物(2%v/v)を用いて、50mLの上記増殖培地をそれぞれ含む20個の250mL三角フラスコに播種した。培養物を27℃、200rpmで24時間発酵させた後、DMSOに溶解させたジクロフェナクを各フラスコに加えて、ジクロフェナクの最終濃度を100mg/Lとした。培養物を27℃、200rpmでインキュベートした。22時間後、2

40

50

0個全てのフラスコの内容物を合わせ、遠心することにより、水性上清を細胞から分離した。この細胞をアセトニトリル(900ml)で1時間抽出した後、再度遠心してアセトニトリル抽出物を集めた。これを前記水性プロス上清と混合し、硫酸アンモニウム(132g)を加えた。この混合物を2相分離するまで攪拌した。アセトニトリル層を集め、回転蒸発することで、水性濃縮物を得た。この物質を、ウォーターズ社製 Symmetry

Shield RP8カラム($19 \times 100\text{ mm}$)を用い、 $17\text{ ml}/\text{分}$ の流速で以下の勾配により溶出される、逆相HPLCで分画した。勾配は、55/45/5(H₂O/MeCN/200mM酢酸アンモニウム(ammonium acetate)+2%辛酸水溶液)から開始し、10分間かけて45/50/5に直線的に増加し、この濃度でさらに20分間維持し、その後、開始条件に戻した。溶出液を280nmでモニターし、6.5分と9分とに溶出したピークを集めて、濃縮乾固したところ、それぞれ5'-ヒドロキシジクロフェナク(11.6mg)および4'-ヒドロキシジクロフェナク(12.4mg)が得られた。

【0124】

¹H NMR (500 MHz, DMSO-d6):

【0125】

5'-ヒドロキシジクロフェナク: 7.43 (2H, d, 8.1 Hz), 7.03 (1H, t, 8.1 Hz), 6.65 (1H, d, 2.8 Hz), 6.49 (1H, dd, 8.5, 2.8 Hz), 6.25 (1H, d, 8.5), 3.57 (2H, s).

【0126】

4'-ヒドロキシジクロフェナク: 7.03 (1H, dd, 7.5, 1.6 Hz), 6.92 (2H, s), 6.90 (1H, dd, 7.6, 1.6 Hz), 6.66 (1H, td, 7.4, 1.2 Hz), 6.08 (1H, dd, 8.0, 1.2 Hz), 3.43 (2H, s).

【0127】

実施例4: P450_{aluc09}およびフェレドキシン_{aluf03}のクローニング

アミコラトプシス・ルリダ(NRRRL2430)からのゲノムDNAの抽出

アミコラトプシス・ルリダ(NRRRL2430)の発酵物質の細胞ペレットからゲノムDNA(gDNA)を単離した。4g/L酵母エキス、10g/L麦芽エキス、4g/Lグルコースを含有し、pH7.0に調整された培地。2個の250ml体積の三角フラスコに、この培地をそれぞれ50ml含ませ、115℃で20分間滅菌した。アミコラトプシス・ルリダ(NRRRL-2430)を、液体窒素中に保存されたクライオバイアル内ストックから戻して、50mlの上記増殖培地を含む2個のフラスコ内に播種した。27℃、200rpmで2日間増殖させた後、50mlの培養液を50ml遠心管に移し、遠心して、ペレット化された細胞を集めた。このペレットを等張緩衝液で1回洗浄することで残留培地成分を除去し、その後、下記の通りの後のゲノムDNA抽出用にこのペレットを-80℃で凍結した。この細胞ペレットを解凍し、7.5mlのTE緩衝液(10mMトリス塩酸(pH7.5)、1mM Na₂EDTA)に再懸濁した。75μlの20mg/mlリゾチーム溶液を加え、その溶液を37℃で1時間インキュベートした後、750μlの10%(w/vol)SDSを加え、反転により混合した。20μlの20mg/mlプロナーゼを加え、37℃で1.5時間インキュベートした後、その溶液に16μlの10mg/mlRNase溶液を加え、続いて、37℃で1時間および50℃で1時間の別のインキュベーション工程を行った。900μlの0.5M NaCl溶液を加えた後、その溶液を等量のフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール(25:24:1; Sigma-Aldrich)で2回抽出した。水層を集め、1倍量のイソプロパノールおよび遠心分離(10,000×g、30分間、20℃)でゲノムDNAを沈殿させた。ゲノムDNAペレットを100%エタノールで1回、70%エタノールで2回洗浄した(各洗浄工程で約30ml)。ゲノムDNAペレットを風乾し、5mlのTE緩衝液に再懸濁させた。NanoDrop装置(サーモサイエンティフィック社(Thermo Scientific))を用いてゲノムDNAの濃度および純度を測定し、ゲノムDNAの完全性をアガロースゲル電気泳動で評価した。

【0128】

10

20

30

40

50

P C R 反応

遺伝子間領域を含めて、P 4 5 0 a l u C 0 9 (GenBank : A J K 5 2 1 8 4 . 1 ; UniProt アクセッション (Uniprot Accession) : A 0 A 0 9 3 B C G 8 ; ローカルタグ (Locus tag) : B B 3 1 _ 0 1 5 3 5)と、フェレドキシン a l u F 0 3 (GenBank : A J K 5 2 1 8 3 . 1 ; UniProt アクセッション : A 0 A 0 9 3 B I Z 3 ; ローカルタグ : B B 3 1 _ 0 1 5 3 0)とから構成されるオペロンをコードするDNA配列を、ゲノムDNAから、a l u C 0 9 - F 0 3 _ f プライマー (5' - プライマー配列 - 3' : g t t t a a c t t a a g a a g g a g a t a C A T A T G A C T G A C G T C G A G G A A A C C A C) (配列番号5)と、a l u C 0 9 - F 0 3 _ r プライマー (5' - プライマー配列 - 3' : g a g g g c g g g g c a t A A G C T T C C T A T T A A G C G A G C G A C A A G G) (配列番号6)とを用いる総反応体積 50 μl のPCRにより、増幅した。PCR反応は、10 μl の5×HF緩衝液、1.5 μl のDMSO、1 μl の10 mM dNTP、0.5 μl のPhusion (登録商標) High-fidelity DNA Polymerase (1ユニット; ニュー・イングランド・バイオラボ社 (New England Biolabs))、約90 ng のゲノムDNA、各0.5 μM のフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含有し、この反応はM 1 1 i Q (登録商標) のH₂Oで総体積 50 μl にフィルアップした。バイオラド社製 (Biolograd) C 1 0 0 0 Touch (商標) サーマルサイクラーシステムで、以下のサイクル条件を用いて、PCR反応を行った：98°、30秒間、35サイクル (98°、10秒間、57°、15秒間、72°、45秒間)、72°、5分間。PCRアンプリコンの予測サイズは1468 bp であった。

【0129】

プラスミド骨格 p Q R 3 6 8 b b をコードするDNA配列を、プラスミド p Q R 3 6 8 (Hussain & Ward. Appl Environ Microbiol. 2003; 69:373-82) から、p Q R 3 6 8 _

b b S C F 1 5 a _ f プライマー (5' - プライマー配列 - 3' : t a a t a g g A A G C T T A T G C C C C G C C C T C T G C G G G) (配列番号7) および p Q R 3 6 8 _ b b S C F 1 5 a _ r プライマー (5' - プライマー配列 - 3' : g c c g c c C A T A T G T A T A T C T C C T T C T T A A G T T A A A C) (配列番号8) を用いる総反応体積 50 μl のPCRによって、増幅した。PCR反応は、10 μl の5×HF緩衝液、1.5 μl のDMSO、1 μl の10 mM dNTP、0.5 μl のPhusion (登録商標) High-fidelity DNA Polymerase (1ユニット)、15 ng のプラスミドDNA p Q R 3 6 8 、各0.5 μM のフォワードプライマーおよびリバースプライマーを含有し、この反応はM 1 1 i Q (登録商標) のH₂Oで総体積 50 μl にフィルアップした。バイオラド社製 C 1 0 0 0 Touch (商標) サーマルサイクラーシステムで、以下のサイクル条件を用いて、PCR反応を行った：98°、30秒間、35サイクル (98°、10秒間、56°、15秒間、72°、3分25秒)、72°、10分間。PCRアンプリコンの予測サイズは6768 bp であった。

【0130】

全てのPCR反応をアガロースゲル電気泳動解析にかけ、そのアガロースゲルからQIAquick (登録商標) Gel Extraction Kit (キヤゲン社 (Qiagen)) を用いてPCR産物を抽出した。NanoDrop装置 (サーモサイエンティフィック社) を用いて、精製されたPCR産物のDNA濃度を測定した。

【0131】

P 4 5 0 a l u C 0 9 - a l u F 0 3 のクローニング

環状ポリメラーゼ伸長クローニング (circular polymerase extension cloning) (CPEC; Quan & Tian. Nat Protoc. 2011;6:242-51) により、P 4 5 0 a l u C 0 9 - フェレドキシン a l u F 0 3 オペロンをベクター骨格 p Q R 3 6 8 b b にクローニングした。

【0132】

10

20

30

40

50

C P E Cに先立ち、前記p Q R 3 6 8 b bアンプリコンをN d e I制限酵素で消化して、p Q R 3 6 8 _ b b S C F 1 5 a _ rプライマーにより導入された5'オーバーハングを除去した。10 μlの10×Cut Smart buffer(登録商標)、1.5 μlのN d e I(30ユニット；ニュー・イングランド・バイオラボ社)、約1.7 μgのp Q R 3 6 8 b b PCR産物を含有する総体積100 μlで、37℃で4時間、制限消化を行ったが、この反応はM i l l i Q(登録商標)のH₂Oで100 μlにフィルアップした。65℃で20分間のN d e Iの不活性化により反応を止めた。Q I A q u i c k(登録商標)PCR Purification Kit(キアゲン社)を用いて、消化後のp Q R 3 6 8 b b PCR産物を精製した。

【0133】

P 4 5 0 a l u C 0 9 - フェレドキシン_{a l u F 0 3}オペロンのp Q R 3 6 8 b bへのC P E Cを、4 μlの5×H F緩衝液、0.6 μlのD M S O、1.6 μlの10 mM d N T P、104 ngのp Q R 3 6 8 b bベクター骨格、43 ngのP 4 5 0 a l u C 0 9 - フェレドキシン_{a l u F 0 3}PCR産物、および0.2 μlのPhusion(登録商標)High - Fidelity DNA Polymerase(0.4ユニット)を含有する総反応体積20 μlにおいて行った。バイオラド社製C 1 0 0 0 Touch(商標)サーマルサイクルシステムで、以下のサイクル条件を用いて、C P E C反応を行った：98℃、30秒間、5サイクル(98℃、10秒間、50℃、30秒間、72℃、2分45秒)、72℃、5分間。4 μlのC P E C反応物を用いて、50 μlのケミカルコンピテント大腸菌D H 5細胞を形質転換した。37℃で12～16時間インキュベートした後、100 μg / m lアンピシリンを含有する溶原培地(L B)プレート上でクローンを選択した。クローンをピッキングし、100 μg / m lアンピシリンを含有する5 m lのL B中で、37℃、250 rpmで12～16時間培養した。Q I A p r e p(登録商標)Spin Miniprep Kit(キアゲン社)を用いて、これらの培養物から組換えプラスミドを単離し、適切な酵素を用いた制限消化によって解析した。

【0134】

DNAの塩基配列決定および解析

クローニングされたP 4 5 0 a l u C 0 9 - フェレドキシン_{a l u F 0 3}オペロンおよびp Q R 3 6 8 b bベクター骨格の還元酵素部分というDNA配列を、ユーロフィンジェノミクス社(Eurofins Genomics)(ドイツ)におけるサンガー法シーケンシングで確認した。構築したプラスミドはp Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3と称した。

【0135】

組換え発現菌株の構築

P 4 5 0 a l u C 0 9 、 フ ェ レ ド キ シ ソ a l u F 0 3 お よ び フ ェ レ ド キ シ ソ 還 元 酵 素 S C F 1 5 A の組換え発現用の宿主として、大腸菌B L 2 1 Star(D E 3) p L y s S 株(インビトロジエン社)を用いた。この発現菌株を構築するために、ヒートショック法を用いて、大腸菌B L 2 1 Star(D E 3) p L y s S 細胞をプラスミドp Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3で形質転換した。50 μlのケミカルコンピテントセルを0.5 μl(68 ng)のプラスミドp Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3と混合した後、氷上で50分間インキュベートする。42℃の水浴中で45秒間のヒートショックを行った後、細胞を氷上でおよそ2分間冷却した。800 μlのL Bを添加した後、Thermoshaker(エッペンドルフ社(Eppendorf))において、37℃、500 rpmで1.5時間、細胞をインキュベートした。この混合物1 μlをL B 50 μlと混合し、100 μg / m lアンピシリンおよび34 μg / m lクロラムフェニコールを含有するL Bプレートに播種した。プレートを37℃でおよそ14時間インキュベートした。

【0136】

この発現菌株のグリセロールストックを作製するため、單一コロニーをピッキングし、同一の抗生物質を含有する5 m lのL Bに播種し、37℃、250 rpmでおよそ14時間培養した。この培養物500 μlを、クライオバイアル内の500 μlの50% (v o

10

20

30

40

50

1 / v o l) グリセロールと混合し、- 8 0 で保存した。

【 0 1 3 7 】

実施例 5 : 組換え A l u C 0 9 - A l u F 0 3 の発現

形質転換 / 寒天プレート :

1 0 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンおよび 2 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールを、5 0 % グリセロール凍結ストックから得た p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3 プラスミドを持つ大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s S と共に画線することによって、L B 寒天プレートに対して添加し、3 7 で一晩インキュベートした。

【 0 1 3 8 】

播種 :

3 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールおよび 1 0 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを添加した 5 mL の L B M i l l e r 培地に、上記のように作製された寒天プレートから得られた大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s S / p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3 の單一コロニーを接種した。細胞を 3 7 、 2 0 0 r p m で一晩増殖させた。

10

【 0 1 3 9 】

接種 :

バッフル付 2 5 0 mL フラスコに、3 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のクロラムフェニコールと 1 0 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンとを添加した 5 0 mL のテリフィックブロス (Terrific Broth) 培地を、0 . 5 mL の前記播種培養物と共に接種し、O D (6 0 0) が 0 . 6 ~ 0 . 8 に達するまで 3 7 、 2 0 0 r p m で細胞増殖させた。この時点で、0 . 1 mM の最終濃度に達するまで I P T G を添加することにより遺伝子発現を誘導し、さらに、この培養物に F e S O 4 および 5 ' - アミノレブリン酸をそれぞれ 0 . 1 mM および 8 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度に達するまで添加した。誘導された細胞を 2 7 、 1 4 0 r p m でさらに 4 時間培養した後、培養物を遠心分離で回収した。

20

【 0 1 4 0 】

実施例 6 : 酵素物質の抽出および加工

実施例 5 に記載されるように、1 g の細胞に対し 1 5 mL の緩衝液の割合で、5 0 mM リン酸カリウム緩衝液 (p H 7 . 4) 、 5 mM M g C l 2 、 0 . 1 mM D T T 、および 1 mM P M S F 中に、組換え P 4 5 0 a l u c 0 9 、フェレドキシン a l u F 0 3 およびフェレドキシン還元酵素 S C F 1 5 A を含有する、細胞ペレットの懸濁物を得た。3 サイクルの 3 0 k p s i による高圧破壊で、溶解細胞を得た。溶解した物質を 3 8 , 0 0 0 × g で 3 0 分間 (4) 遠心分離し、その上清を 0 . 2 2 ミクロンフィルターに通すことにより滅菌することで、2 . 9 μM の組換え P 4 5 0 a l u c 0 9 および 9 1 9 U N の組換えフェレドキシン還元酵素を含有する酵素調製物を得た。次に、この粗抽出物をガラス製バイアルに分注し (2 mL バイアル当たり 0 . 5 mL) 、エドワーズ社 (Edwards) 製 S u p e r m o d u l y o 凍結乾燥機を用いて凍結および凍結乾燥し、その後、使用のために必要とされるまで標準的な実験用冷凍庫内で - 2 0 で保存した。

30

【 0 1 4 1 】

実施例 7 : ヒドロキシラーゼ活性 / スペクトラム試験

40

実施例 5 および実施例 6 に記載されるように、組換え P 4 5 0 a l u c 0 9 、フェレドキシン a l u F 0 3 およびフェレドキシン還元酵素 S C F 1 5 A の凍結乾燥物質を作製し、最終濃度 2 . 9 μM の P 4 5 0 A l u c 0 9 および最終濃度 9 1 9 U N のフェレドキシン還元酵素 S C F 1 5 A となるように水に懸濁させた。3 0 の以下の条件下で生体触媒作用を実施した：最終体積 1 0 0 μL 中、5 0 mM のリン酸カリウム (p H 7 . 4) 、 5 mM の M g C l 2 、 0 . 1 mg / mL の基質化合物、例えば、ボセンタン (カルボシンス社 (CarboS ynth Ltd) 、英国) 、 ブバルバコン (メドケムトロニカ社 (MedChemtronica) 、スウェーデン) 、 B I R B 7 9 6 (ストラテック・サイエンティフィック社 (Stratech Scientific Limited) 、英国) 、 ジクロフェナク (シグマ・アルドリッヂ社、英国) 、エポチロン B (L C ラボラトリーズ社 (LC Laboratories) 、米国) またはリトナビル (

50

T C I 社、英国)、チバンチニブ(メドケムトロニカ社、スウェーデン)、2.4 μMのP 4 5 0 A l u c o 9、7 6 7 U Nのフェレドキシン還元酵素S C F 1 5 A、5 mMのG 6 P、1 mMのN A D P、2 U N / m l のG 6 P D H。16~20時間後、反応物を等量のアセトニトリルで抽出し、遠心分離することで沈殿したタンパク質を除去し、U P L C - M S 解析で変換を評価した。

【0142】

U P L C データは以下のように得た。

カラム：A c q u i t y U P L C B E H S h i e l d R P 1 8、1.7 μm、内径2.1 mm、長さ50 mm

溶媒：H₂O、B：アセトニトリル、共に0.1%ギ酸を含有

流速：1.0 ml / 分

検出器：ウォーターズ社製A c q u i t y U P L C P D A (紫外可視検出)およびウォーターズ社製A c q u i t y U P L C Q D A (M S)

滞留時間：ボセンタン基質：1.75分；ヒドロキシ化されたボセンタン：1.42分

【0143】

クロマトグラフィーの保持および質量スペクトルは基準試料のそれと一致した。

【0144】

実施例8：ヒドロキシラーゼ活性に対する溶液pHの影響

実施例7に記載された凍結乾燥物質と同様に作製された凍結乾燥物質を用いて、様々な反応pHのヒドロキシラーゼ活性に対する影響を、ボセンタンとジクロフェナクという2種類の基質を用いて評価した。緩衝液交換の部分を除き実施例7の方法に従った。4種類の異なる緩衝液を選んだ：a) 50 mM 酢酸塩 pH 5、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂；b) 50 mM リン酸カリウム pH 7.5、5 mM MgCl₂；c) 50 mM Tris pH 8、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂；d) 50 mM ピペリジン pH 11、100 mM NaCl、5 mM MgCl₂。各緩衝液条件について、凍結乾燥された粗抽出物の懸濁液1.5 mlを、濃縮および新たな緩衝液による前記物質の希釈を3サイクル行うことによりカットオフされたV i v a s p i n 20 Kを用いて交換した。50 mM リン酸カリウム pH 7.5、5 mM MgCl₂で交換したとき、酵素調製物の作製および評価用に通常の前記緩衝液は、緩衝液交換プロセス中の前記物質のロバストネス制御を与えた。表示pHで16~20時間インキュベートした後、反応物を等量のアセトニトリルで抽出し、遠心分離により沈殿タンパク質を除去し、実施例7に記載されたU P L C - M S 解析と同様のU P L C - M S 解析により変換を評価した。結果を図10および図11に示す。ヒドロキシラーゼ活性が7.5以上のpH値(pH 8~11)で変わらないこと、および、ヒドロキシラーゼ活性がpH 5ではほとんど検出されないこと、が示された。特に注目すべきは、そのような高pH値(例えばpH値11)におけるこの組換え酵素の活性である。そのようなpHでも反応を触媒可能であることは、カルボキシル部分を有する化合物等の、pHが高くなるほど溶解性が向上する選択された基質について、基質添加量を増加させることができるため、特別な商業的利点をもたらす。より高いpHにおける触媒作用の他の利点は、化学合成、原料の塩基触媒加水分解、またはpH上昇を利用して反応が停止された別の酵素による反応産物等、生成物をもたらした前の工程から係る生成物をそのまま利用できることである。

【0145】

実施例9：ヒドロキシラーゼ活性に対するインキュベーション温度の影響

実施例7に記載された凍結乾燥物質と同様に組換えP 4 5 0 a l u c o 9、フェレドキシンa l u F 0 3 およびフェレドキシン還元酵素S C F 1 5 Aの凍結乾燥物質を用いて、様々なインキュベーション温度のヒドロキシラーゼ活性に対する影響を、ボセンタン、ジクロフェナク、リトナビル、およびチバンチニブ(tivantinib)という4種類の基質を用いて評価した。評価した温度は表1に示した通りであった。表示温度で16~20時間インキュベートした後、反応物を等量のアセトニトリルで抽出し、遠心分離により沈殿タンパク質を除去し、実施例7に記載されたU P L C - M S 解析と同様のU P L C - M S 解析により

10

20

30

40

50

変換を評価した。結果を表1に示す。ヒドロキシラーゼ活性は10において概して最も高く、22と27においても同様の触媒変換であったが、37への、さらには45への温度の上昇によって変換は大きく減少した。

【0146】

表1：ボセンタン、ジクロフェナク、リトナビル、およびチバンチニブ(tivantinib)を対象としたP450_{aluc09}-フェレドキシン_{aluf03}-フェレドキシン還元酵素_{SCF15A}のヒドロキシラーゼ活性に対する温度の影響

【表1】

	10°C	22°C	27°C (標準状態)	37°C	45°C
H0-ボセンタン	91%	64%	86%	33%	19%
5-HO-ジクロフェナク	17%	14%	12%	1%	
4'-HO-ジクロフェナク	14%	16%	21%	13%	
ε-HO-リトナビル	36%	36%	34%	19%	
H0-チバンチニブ (Tivantinib) (M4/M5)	11%	8%	6%		

10

20

30

【0147】

実施例10：異なるプラスミドコピー数におけるヒドロキシラーゼ活性

高コピープラスミド(pUC複製開始点)と中コピープラスミド(pBR322複製開始点)においてP450_{aluc09}、フェレドキシン_{aluf03}およびフェレドキシン還元酵素_{SCF15A}を発現する組換え型菌株の、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活性を比較した。

【0148】

高コピー型pQR368bb-aluc09-aluf03の構築

pQR368bb-aluc09-aluf03プラスミドから、P450_{aluc09}-フェレドキシン_{aluf03}-フェレドキシン還元酵素_{SCF15A}オペロンを切り出し、T4 DNAリガーゼにより、高コピーpUC複製開始点を含有するベクター骨格にサブクローニングした。

【0149】

pQR368bb-aluc09-aluf03プラスミドをNdeIおよびNotIで消化することによりP450_{aluc09}-フェレドキシン_{aluf03}-フェレドキシン還元酵素_{SCF15A}オペロンを得て、QIAquick (登録商標) Gel Purification Kit (キアゲン社)により、アガロースゲルから、2801bpという予測サイズを有するバンドを精製した。

40

【0150】

pD454-SR:242370は、単一の多シストロン性オペロン形態のフェレドキシン_{f d 1}およびフェレドキシン還元酵素_{SCF15A}(配列番号9)を含有する高コピーベクターであり、DNA2.0社によって構築された。このpD454-SR:242370プラスミドを、NdeIおよびNotIによって消化し、4021bpという予測サイズを有するバンドを上記のように精製した。切り出された断片(140mg)を、総反応体積を20μLとするT4 DNAリガーゼ(ニュー・イングランド・バイオラボ社)によりベクター骨格(40mg)にライゲーションした。反応物を室温で1.5時間イン

50

キュベートし、さらに 65 度で 20 分間インキュベートして、リガーゼ酵素を不活性化した。ライゲーション反応混合物 (0.5 μL) を、50 μL のケミカルコンピテント大腸菌 DH5 に、化学的な形質転換によって直接導入した。組換え型菌株の塩基配列決定および構築は、実施例 4 に記載されたものと同様に行った。構築したプラスミドは p3C . 1 - AluC09 - AluF03 と称した。

【0151】

全細胞ヒドロキシ化活性に対するプラスミドコピー数の影響

組換え発現株の、pQR368bb - aluC09 - aluF03 を有する大腸菌 BL21 Star (DE3) pLysS および p3C . 1 - AluC09 - AluF03 を有する大腸菌 BL21 Star (DE3) pLysS を、実施例 5 と同様にテリフィックプロス培地で培養し、最終濃度が 1 mM に達するように IPTG を添加することで遺伝子発現を誘導した。実施例 5 と同様に、培養物に FeSO₄ および 5' - アミノレブリン酸を添加した。

【0152】

27 、 200 rpm で 4 時間インキュベートした後、24 ウエルブロック (エンジスクリーン社 (Enzysscreen)) 内で、2.5 mL の誘導培養物に、10 μL のボセンタンまたはジクロフェナク (各 25 mg / mL) を投与した。この全細胞生体触媒活性反応物を、30 、 300 rpm で 24 時間さらにインキュベートした。等量のアセトニトリルで反応を止め、実施例 7 における記載と同様に UPLC - MS 解析により変換を評価した。

【0153】

異なる数のプラスミドコピーを有する組換え型菌株は共に、全細胞生体内変換において、ボセンタンおよびジクロフェナクをヒドロキシ化することができた。親代謝産物の変換率を表 2 に示す。高コピー発現株 (p3C . 1 - AluC09 - AluF03) と比較した場合、中コピー発現株 (pQR368bb - aluC09 - aluF03) は、ボセンタンおよびジクロフェナクに対する全細胞ヒドロキシラーゼ活性の向上を示した。この結果は、様々なプラスミドコピー数の使用により発現を加減でき、直観に反してはいるが、高コピー数プラスミドよりも低コピー数プラスミドの使用が好ましいことを示している。

【0154】

表 2 : 様々なプラスミドコピー数の全細胞生体触媒作用に対する影響

【表 2】

代謝産物	親由来生成物のうちの収率 (%)	
	中コピー数菌株 (pQR368bb-aluC09-aluF03)	高コピー数菌株 (p3C. 1-AluC09-AluF03)
H0-ボセンタン 568m/z	52.6	18.2
5-H0-ジクロフェナク 310m/z	60.3	23.8
4`-H0-ジクロフェナク 310m/z	27.4	8.7

【0155】

実施例 11 : 異なる抗生物質耐性マーカーを用いたヒドロキシラーゼ活性

アンピシリン耐性プラスミドとカナマイシン耐性プラスミドとにおいて P450_{AluF03} 、フェレドキシン_{AluF03} およびフェレドキシン還元酵素 SCF15A を発現する組換え型菌株の、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活

10

20

30

40

50

性を比較した。

【0156】

pQR368bb-aluC09-aluF03のカナマイシン耐性誘導体の構築
pQR368bb-aluC09-aluF03プラスミドからP450aluC09-フェレドキシンaluF03-フェレドキシン還元酵素SCF15Aオペロンを切り出し、実施例10における実施と同様に、NdeIおよびNotIを介し、T4DNAリガーゼによって、pET29aベクター骨格にクローニングした。構築したプラスミドはpHD02-AluC09-AluF03と称した。

【0157】

抗生物質選択マーカーの全細胞ヒドロキシ化活性に対する影響

組換え発現株の、pQR368bb-aluC09-aluF03を有する大腸菌BL21Star(DE3)pLysSおよびpHD02-AluC09-AluF03を有する大腸菌BL21Star(DE3)pLysSの全細胞ヒドロキシ化活性を、実施例10の記載と同様に実施した。

【0158】

アンピシリン耐性組換え発現菌株およびカナマイシン耐性組換え発現菌株は共に、全細胞生体内変換において、ボセンタンおよびジクロフェナクをヒドロキシ化することができた。親代謝産物の変換率を表3に示す。アンピシリン耐性発現株(pQR368bb-aluC09-aluF03)と比較した場合、カナマイシン耐性発現株(pHD02-AluC09-AluF03)は、ボセンタンおよびジクロフェナクに対する全細胞ヒドロキシラーゼ活性の向上を示した。このデータは、異なる抗生物質耐性遺伝子の使用により発現レベルを向上でき、より安定な抗生物質を使用するほど全培養期間を通じてより大きな選択圧が得られることを示している。

【0159】

表3：異なる抗生物質耐性マーカーの全細胞生体触媒作用に対する影響

【表3】

代謝産物	親由来生成物のうちの収率(%)	
	アンピシリン耐性菌株 (pQR368bb-aluC09-aluF03)	カナマイシン耐性菌株 (pHD02-AluC09-AluF03)
H0-ボセンタン 568m/z	26.6	41.6
5-H0-ジクロフェナク 310m/z	35.2	48.1
4'-HO-ジクロフェナク 310m/z	7.5	6.0

10

20

30

40

【0160】

実施例12：異なるBL21由来発現宿主を用いたヒドロキシラーゼ活性：

異なるBL21由来発現宿主においてP450aluF03、フェレドキシンaluF03およびフェレドキシン還元酵素SCF15Aを発現する組換え型菌株の、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活性を比較した。

【0161】

組換え発現菌株の構築

実施例4における記載と同様に、pQR368bb-aluC09-aluF03プラスミドを各種BL21由来発現宿主に導入した。

50

【0162】

発現宿主の全細胞ヒドロキシ化活性に対する影響

p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3 プラスミドを全て持つ各種組換え発現株、大腸菌BL21 Star (DE3) pLysS、大腸菌BL21 Star (DE3)、大腸菌BL21 (DE3) および大腸菌BL21 (DE3) pLysS の全細胞ヒドロキシ化活性を、実施例10の記載と同様に実施した。

【0163】

全ての発現菌株が、全細胞生体内変換において、ボセンタンおよびジクロフェナクをヒドロキシ化することができた。親代謝産物の変換率を表4に示す。*p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3* を持つ大腸菌BL21 (DE3) pLysSは、他のBL21誘導発現宿主と比較して、ボセンタンおよびジクロフェナクに対してより大きな全細胞ヒドロキシラーゼ活性を示した。表4の結果は、*P 4 5 0 a l u F 0 3 - フェレドキシン A 1 u F 0 3 - フェレドキシン還元酵素 S C F 1 5 A* 多シストロン性オペロンが、他のBL21由来発現宿主において発現可能であり且つ触媒活性があることを示している。

10

【0164】

表4：異なるBL21由来発現宿主を用いて観察された全細胞生体触媒活性

【表4】

代謝産物	親由来生成物のうちの収率 (%)			
	大腸菌BL21 Star (DE3) pLysS	大腸菌BL21 Star (DE3)	大腸菌 BL21 (DE3)	大腸菌BL21 (DE3) pLysS
H0-ボセンタン 568m/z	26.6	9.1	13.6	34.1
5-H0-ジクロフェナク 310m/z	35.2	6.5	10.3	45.1
4'-H0-ジクロフェナク 310m/z	7.5	1.5	>1	11.3

20

30

【0165】

実施例13：他の酸化還元パートナーを用いたヒドロキシラーゼ活性：

A：元のフェレドキシン_{a l u F 0 3}のストレプトマイセス・グリセウス(11796)由来フェレドキシン_{f d 1}との交換

P 4 5 0 a l u F 0 3 と、フェレドキシン還元酵素_{S C F 1 5 A} と、元のフェレドキシン_{a l u F 0 3} または近縁生物由来の別のフェレドキシン(ストレプトマイセス・グリセウス(*S. griseus*) (11796)由来のF_{d 1}、Hussain & Ward., Appl Environ Microbiol. 2003; 69(1):373-82)とを発現する組換え型菌株の、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活性を比較した。

40

【0166】

PCR反応

p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3 由来 *P 4 5 0 a l u C 0 9* を *p D 4 5 4 - S R : 2 4 2 3 7 0* プラスミドにクローニングすることによって、元のフェレドキシン_{a l u F 0 3}を、ストレプトマイセス・グリセウス(11796)由来のフェレドキシン_{f d 1}と交換した。前記 *P 4 5 0 a l u C 0 9* 遺伝子は、*p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3* プラスミドDNAから、*a l u C 0 9 _ p 3 C _ F* プライマー(5' - プライ

50

マー配列 - 3' : c t t t t t g a g a c c t a a g g a g g t a a a a a A T G T C T
 C A T A T G A C T G A C G T C G A G G A A A C C A C) (配列番号12) および a l
 u C 0 9 _ p 3 C _ R プライマー (5' - プライマー配列 - 3' : g a t c c g c a c t c
 a c c c g c a t g g t c a t g a a t t c t g t t t c c t a a T T
 A C C A G G T G A C C G G A A G G G C G) (配列番号13) を用いたPCRにより、
 実施例4の記載と同様に増幅した。1294 bp の予測サイズのアンプリコンをアガロースゲルから精製した。

【0167】

p 3 C - A l u C 0 9 プラスミドの構築

p D 4 5 4 - S R : 2 4 3 7 0 プラスミドを N d e I および E c o R I で消化して、予測サイズが 5 6 1 6 b p の生成物を得た。この消化生成物を、実施例4に記載のようにアガロースから精製した。G i b s o n a s s e m b l y (ニューアイ・イングランド・バイオラボ社) により、この精製DNAを、N d e I および E c o R I で消化された p D 4 5 4 - S R : 2 4 2 3 7 0 プラスミドにアセンブルした。プロトコルは製造業者の取扱説明書に従い、等温インキュベーション工程は 20 分間行った。構築したプラスミドは p 3 C - A l u C 0 9 と称した。

【0168】

元のフェレドキシン a l u F 0 3 のストレプトマイセス・グリセウス (11796) 由来フェレドキシン f d 1 との交換の全細胞ヒドロキシ化活性に対する影響

実施例10の記載と同様にして、p 3 C . 1 - A l u C 0 9 - A l u F 0 3 プラスミドまたは p 3 C - A l u C 0 9 プラスミドを有する大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s S の、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活性を比較した。

【0169】

両方の発現菌株が、全細胞生体内変換において、ボセンタンおよびジクロフェナクをヒドロキシ化することができた。親代謝産物の変換率を表5に示す。元のフェレドキシンパートナーを含む p 3 C . 1 - A l u C 0 9 - A l u F 0 3 を持つ大腸菌 B L 2 1 (D E 3) p L y s S は、フェレドキシン f d 1 を発現する菌株と比較した場合、ボセンタンおよびジクロフェナクに対して、より大きな全細胞ヒドロキシラーゼ活性を示した。表5の結果は、フェレドキシン f d 1 の場合は程度が小さくなるが、ストレプトマイセス・グリセウス (11796) 由来のフェレドキシン f d 1 等の、近縁微生物由来の他のフェレドキシンパートナーであっても、還元型NADH補因子または還元型NADPH補因子からシトクロムへの電子移動を支持できることを示している。

【0170】

表5：フェレドキシンパートナー交換の全細胞生体触媒活性に対する影響

10

20

30

40

50

【表5】

代謝産物	親由来生成物のうちの収率(%)	
	元のフェレドキシン _{aluF03} (p3C.1-AluC09-AluF03)	フェレドキシン _{fd1} (p3C-AluC09)
H0-ボセンタン 568m/z	52.6	6.3
5-H0-ジクロフェナク 310m/z	23.8	4.2
4'-H0-ジクロフェナク 310m/z	60.3	11.5

【0171】

B : A l u F 0 3 - S C F 1 5 A フェレドキシン - フェレドキシン還元酵素のプチダ菌由来 P d R - P d X との交換

さらに、P 4 5 0 a 1 u c 0 9 が他の酸化還元パートナーからも電子を受け取れることを確認するために。p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3 プラスミド由来のフェレドキシン_{aluF03}およびフェレドキシン還元酵素S C F 1 5 Aを、プチダ菌(Psuedomonas putida)(A T C C 1 7 4 5 3)由来のフェレドキシン_{c a m B}およびフェレドキシン還元酵素_{c a m A}酸化還元パートナーと交換した(Koga et al. J Biochem. 1989; 106(5):831-6)。

【0172】

P C R 反応

フェレドキシン還元酵素_{c a m B} - フェレドキシン_{c a m A}オペロンを、プチダ菌(A T C C 1 7 4 5 3)から、P d R - P d x _ o p _ F プライマー(5' - プライマー配列 - 3' : g t a a a a a a t g t c t c a t A T G G G C G G C G A A T T C A T G A A C G C A A A C G A C A A C G T G)(配列番号17)およびP d R - P d x _ o p _ R プライマー(5' - プライマー配列 - 3' : g t g a g a c c t c a a a c c g c g g c c g c t c a T T A C C A T T G C C T A T C G G G A A C)(配列番号18)を用いたP C Rによって、実施例4の記載と同様に増幅した。1 7 0 4 b p の予測サイズのアンプリコンをアガロースゲルから精製した。

【0173】

p C a m A B n プラスミドの構築

実施例13の記載と同様にして、G i b s o n a s s e m b l yにより、この精製D N Aを、E c o R I およびN o t Iで消化されたp D 4 5 4 - S R : 2 4 2 3 7 0 プラスミドにアセンブルした。構築したプラスミドはp C a m A B nと称した。

【0174】

p E T 2 9 a - P d R - P d X の構築

実施例10の記載と同様にして、フェレドキシン還元酵素_{c a m A} - フェレドキシン_{c a m B}オペロンを、p C a m A B n からp E T 2 9 a プラスミドにサブクローニングした。p C a m A B n プラスミドおよびp E T 2 9 a プラスミドはE c o R I およびN o t Iで消化し、それぞれ1 6 5 8 b p および5 3 4 5 b p の断片をアガロースゲルから精製した。フェレドキシン還元酵素_{c a m A} - フェレドキシン_{c a m B}オペロンを、T 4 D N Aリガーゼによりp E T 2 9 a ベクター骨格にサブクローニングした。構築したプラスミドはp E T 2 9 a - P d R - P d Xと称した。

10

20

30

40

50

【0175】

pHD02 - AluC09 - PdR - PdXの構築

P450aluC09遺伝子をpET29a - PdR - PdXプラスミドにクローニングすることで、P450aluC09、フェレドキシン還元酵素camAおよびフェレドキシンcamBを含有する単一の多シストロン性オペロンを得た。

【0176】

前記P450aluC09遺伝子は、pQR368bb - aluC09 - aluF03プラスミドDNAから、AluC09_fプライマー(5' - プライマー配列 - 3' : atttttgtttaactttaaaggaaaggatatacatATGACTGACGT CGAGGAAAC) (配列番号19)およびAluC09_rプライマー(5' - プライマー配列 - 3' : gacgatgaccacgttgtcgtttgcggttcatgaaattctgtttccataaATTACCAAGGTGACCGGAAAG) (配列番号20)を用いたPCRにより、実施例4の記載と同様に増幅した。1295bpの予測サイズのアンブリコンをアガロースゲルから精製した。実施例13Aの記載と同様にして、Gibson assemblyにより、この精製DNAを、NdeIおよびEcoRIで消化されたpET29a - PdR - PdXプラスミドにアセンブルした。構築したプラスミドはpHD02 - AluC09 - PdR - PdXと称した。

10

【0177】

フェレドキシンaluF03およびフェレドキシン還元酵素SCF15Aとプチダ菌(ATCC17453)由来のフェレドキシン還元酵素camAおよびフェレドキシンcamBとの交換の全細胞ヒドロキシ化活性に対する影響

20

実施例10の記載と同様にして、pHD02 - AluC09 - AluF03プラスミドまたはpHD02 - AluC09 - PdR - PdXプラスミドを有する大腸菌BL21(DE3)の、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活性を比較した。

【0178】

両方の発現菌株が、全細胞生体内変換において、ボセンタンおよびジクロフェナクをヒドロキシ化することができた。親代謝産物の変換率を表6に示す。フェレドキシン還元酵素camAおよびフェレドキシンcamBを発現する菌株と比較した場合、元のフェレドキシンパートナーを含むpHD02 - AluC09 - AluF03を持つ大腸菌BL21(DE3)は、ボセンタンおよびジクロフェナクに対して、より大きはあるが同様の全細胞ヒドロキシラーゼ活性を示した。表5の結果と合わせて、表6の結果は、P450aluC09の生体触媒活性が、元のフェレドキシンパートナー以外の他のフェレドキシンパートナーとのペアリングを介して変化し得るため、元のフェレドキシンパートナー以外のフェレドキシンパートナーのより幅広いスクリーニングにより向上が期待できることを示している。

30

【0179】

表6：フェレドキシンおよびフェレドキシン還元酵素のパートナー交換の全細胞生体触媒活性に対する影響

40

50

【表6】

代謝産物	親由来生成物のうちの収率(%)	
	フェレドキシン _{aluF03} および フェレドキシン還元酵素 _{SCF15A} (pHD02-AluC09-AluF03)	フェレドキシン還元酵素 _{camA} およびフェレドキシン _{camB} (pHD02-AluC09-PdR-PdX)
H0-ボセンタン 568m/z	27.4	21.2

10

【0180】

C : P 4 5 0 a l u c 0 9 - B M 3 融合タンパク質

Scheps et al. Microb Biotechnol. 2013; 6(6):694-707に記載される方法と同様にして、P 4 5 0 a l u c 0 9を、巨大菌由来P 4 5 0 B M 3の還元酵素ドメインにインフレームで融合するように操作した。

【0181】

P C R 反応

終止コドンを持たないP 4 5 0 a l u c 0 9を、p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3から、A l u C 0 9 _ B M 3 _ F o r プライマー(5' - プライマー配列 - 3' : t c t c a t A T G A C T G A C G T C G A G G A A A C C A C C) (配列番号21)およびA l u C 0 9 _ L B M 3 _ R e v プライマー(5' - プライマー配列 - 3' : C T G T T C A G T G C T A G G T G A A G G A A T G C T G C C G C C G C T G C C G C C G C T G C C G C C C A G G T G A C C G G A A G G G G C G T G G A G G G C C G) (配列番号22)を用いたP C Rによって、実施例4の記載と同様に増幅した。1 2 6 9 b pの予測サイズのアンプリコンをアガロースゲルから精製した。

20

【0182】

p E T 2 1 a - A l u C 0 9 _ B M 3 プラスミドの構築

p E T 2 1 a _ B M 3 プラスミドはP 4 5 0 B M 3の還元酵素ドメイン(配列番号23)を含有しており、ジェンスクリプト社(Genscript)によって構築された。p E T 2 1 a _ B M 3 プラスミドをN d e IおよびB s m Iで消化し、実施例4の記載と同様にして、7 1 5 5 b pの予測サイズを有するバンドをアガロースゲルから精製した。

30

【0183】

精製したP C R D N AもN d e IおよびB s m Iで消化し、実施例10の記載と同様にして、T 4 D N Aリガーゼにより、上記の精製された消化後p E T 2 1 a _ B M 3断片とライゲーションした。構築したプラスミドはp E T 2 1 a - A l u C 0 9 _ B M 3と称した。

【0184】

P 4 5 0 a l u c 0 9とP 4 5 0 B M 3の還元酵素ドメインとの融合の全細胞ヒドロキシ化活性に対する影響

40

実施例10の記載と同様にして、p Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3プラスミドまたはp E T 2 1 a - A l u C 0 9 _ B M 3プラスミドを有する大腸菌B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s Sの、ボセンタン基質およびジクロフェナク基質に対する全細胞ヒドロキシ化活性を比較した。

【0185】

両方の発現菌株が、全細胞生体内変換において、ボセンタンおよびジクロフェナクをヒドロキシ化することができた。親代謝産物の変換率を表7に示す。P 4 5 0 B M 3の還元酵素ドメインとインフレームで融合されたP 4 5 0 a l u c 0 9を発現する菌株と比較して、元のフェレドキシンパートナーを含むp Q R 3 6 8 b b - a l u C 0 9 - a l u F 0 3を

50

持つ大腸菌 B L 2 1 S t a r (D E 3) p L y s S の方が、ボセンタンおよびジクロフェナクに対してより大きな全細胞ヒドロキシラーゼ活性を示したが、活性の存在によって、P 4 5 0 a l u C 0 9 が融合タンパク質産物に組み込まれた場合も触媒活性を示すことができることが確認された。Scheps et al. *Microb Biotechnol.* 2013; 6(6):694-707に記載される方法と同様にしてリンカーの長さとリンカーの組成を変えることにより、融合産物の活性が向上することが期待される。

【0186】

表7：P 4 5 0 a l u C 0 9 と P 4 5 0 B M 3 の還元酵素ドメインとの融合の全細胞生体触媒活性に対する影響

【表7】

代謝産物	親由来生成物のうちの収率 (%)	
	フェレドキシン _{aluF03} および フェレドキシン還元酵素 _{SCF15A} (pQR368bb-aluC09-aluF03)	P450 _{BM3} の還元酵素ドメインと 融合したP450 _{aluC09} (pET21a-AluC09_BM3)
H0-ボセンタン 568m/z	29.5	9.3
5-H0-ジクロフェナク 310m/z	12.4	<1
4-H0-ジクロフェナク 310m/z	46.0	4.7

10

20

30

40

50

【図2C】

TTCCATGCGACATCTCCGAGGGCATGCCGCCGGTGGCCCTACCGGTAC
GGCGTCGCGCCCAGACCACCGCGGATCAAGGGCATCATTACGGCCCTCCAC
CAGGTGCTCGAACAGCGGCGATTCGGCCCTTCGGCAACGTAACCTCCCA
CCGAGCTGCGACCTGGGACATTCGGCCCTTCAGCGGCTGTGATCTGGC
CACGGCGGCACGGCGGACCGGGGACTTCGCCCCGGGCGATCGACCGA
CGGCTGTAACGGCGGGCGACTTCGTCGCGCTGGTAGCAGCGGCCACCCGA
CTTCCGGGCAACCTGGCGCTGGAGGCGGAAGAGTCGGCCCTCCGGTGT
CGGCAACGTCGGCCCTGGACATCGCCGGCGCTTCGGCAACAGCGGCCAGA
GCTGCTGCCGACCGAGATCCCGCGAACGTCAGGAGGGCTCAAGGCCAA
AGGTCAGCGGCTGGAGGTCAGCTTCGGCCGGCGGCCGGGCGAGCGCA
AGTTCAAGCGGCTGGAGGTCAGCTTCGGCCGGCGGCCGGGCGAGCGCA
GATTCGCGACCCGGGAGGACATCGACTACGAGGAGGGCTGATCGCGACCCG
GCGCGGCAACAAAGCAGGGCCACATGGTCGCCAACAGGCGTGAGACTGGG
GATCGCGCAGCTGGCGACGGCCGACAAAGCTGGCTCGACATCTCCGAG
TCGCGCGGCGAGATCTGGCGGAGGCGACGGGCTGACGGCGCTGCCAC
CGAGCGGCAACGGAGCTGGACGGCCACGGGCAACCGTCAGGCGACCGGCG
CAAGGACTGGGAGCTCAGGGGCTCACCGGGCGTGGCTACCTCTCCGA
CCAGCTGGCCAAGCTGCCCTGGGGAGGACCTCGAGCGGCCACGGCTGGGCG
GGCGCGGGGGCTGCTCAGGAGTCGGCGGAGCACCTGGACCTTCAGTCGAC
CACCGGCTGAGTCGGCGCGGCTGAGTCGGCGCACACCAAGGG
CGAGCGGCAACAGGAGCTGGCGGAGCACGGGCGTGGCTACCTCTCCGA
TCTCCAGACGCCCTTCCTCCCCGGCTCCGGAGGGCTGGACGCCCTCGC
CGAGCGGAGAACGCTGGCGCTCACCCGGAGGGCTGGTAGCCGGCTGAGGC
CGCGGAGAAGGGCAAGGGCAACGGCGACAGGGCTGAGCGCGTGAGACTCG
TTCAGCGCGGAGGACATGCTCCGGAGAGCGGCCCTAATGAGCGGCCGC

フェレドキシン還元酵素(イタリック体)
フェレドキシン(下線)
開始コドンおよび終止コドンは太字

タンパク質配列
(上記DNA配列からE x p a s y を用いて翻訳)

配列番号1-10 (フェレドキシンP41のアミノ酸配列 (69個のアミノ酸残基))
MTMRVSAADRTVCVGAGLCAATPGVFDQDDDGIVTTLAEPAAADDDRRTAREAG
HLCPSGAVRVVEDTE

配列番号 1.1 (フェレドキシン還元酵素 SCF15A のアミノ酸配列 (454 個のアミノ酸残基))

MPRLPRLRAVAGSSGAGIYAADALLKSEVAADPGVSIDIFERMPPGLRYGVAPD
HPRIKGIITALHHQLVDKQPIRQLFNGVNVPYPTDVSLLDRAFYGV|FTAGTADDRLS
LPGIDLGDGSYGAADFVAWVYDHGPDFPRTWPVLEAKEYAVLGVGNVALDIARVLA
ADEPLLTEIPPEWVYEGLKANKALEHVFGVRGGPAQAKFSPMELREDHSPNIEV
ADEPDIDYDEGSIATRRGNKQADMVKTLLENWAIRDVGQFLKFHLHFSPAESLIG
EDGRVTGLRTERTLEDGTGNVKGTEFKDWDVQAVGVLSDQLPKLPWL
ETGTWTGAGGRRVQESGEHLQSTYVTG|WIRRGPIGLIGHTKGDAE NETVSNLDDY
ANGLRQTPSSPAPEVAFLAERNRVRTTWDGWYRLDAAEKAAQGEPHGRERVK
YVEREDMLRESGA

【図2D】

配列番号14 (フェレドキシン還元酵素_{camA}とフェレドキシン_{camB}のコード配列)

ATGAAACGCAAACGACAACGTTGGTCATCGTGGTACCGGACTGGCTGGCTTG
AGGTCGCGCTTCGGCCCTGGCCGGACGGGCTGGGAAGGCCAATATCCGGTGG
TGGGGGATGCGACGGTAATTCCCCATCACCTACCACCGCTATCCCACAGCTTAC
TTGGCGGCAAAAGCCACAGGGAAAGCCTGTACCTGAGAACCCCAGATGCC
ATGCAGCGCAGAACATCCA~~T~~ACTCGGAGGCACACAGGTAACGGCTATCAA
CGCGCAGGCCACAGCAAGTAATCCATCGGATGGCGGGACTGGATTACGAC
CGGCTGGTATTGGTACCGGAGGGCCTGCAAGAACCCCTACCGGCTGGCAGT
GGCGCAGTGGAAAGCGCAAAACTTCCATACCTGCGCAACTCGAGGAGC
CGGAGTGCATTCCCGGCACTGTAGTCGGATAACCGCTGGTGGTGTATTGG
TGGCGGCTACATTGGCCTTGAAGTGGCTGCCACCGCATCAAGGCGAACATG
CACGTACCCCTGCTGATACCGCAGCCCCGGTTGGAGCGGGTTACCGGCC
CGCCGGTATGCCCTTGTAGACGACCTAACCGCGAAGGCCGGTGGACAT
ACGAACCGCCACGCAAGGTGCGGGGTTGAGATGTCGACCGACCAACAGAA
GGTTACCGCGTCTCTGCGAGGACGGACAAGGCTGCGAGCGGATCTGGT
AATCGCCGGATGGCCCTGATACCAAACACTGCGAGTTGGCAGTGCAGCG
CCTCGAGGTGATAACCGCATCGTACAGAACACATGCAGACCTCTGATC
CTTGTGATCATGGCGCTCGCGACTGTGCGGATTTACAGTCAGCTCATGAC
CGCTGGGTGCGTATGAACTGGTGCCTAACATGCCCTGGAGCAGGACGAAAGA
TCGCCGCCATCCTCTGTGGCAAGGTGCCACCGCGATGAGGGCGGCCCTGGT
TCGTGGCATCAGTAGAGATGAGATGGCTGGGACTGTCCGAAGG
GTACGACGGGATCATGGTCCCGGCCCTTGGCGCAACCCGACTTCAGCGTT
TCTACCTGCGAGGGAGACGGGTTATTGGCGCTGATACAGTGAACCGCTCAG
TGGAGTTCAACCACTGCAAAACAAATAATCACGGATGTTGGCGGTTGAACCA
AACCTACTCGGTGACGAAAGCGTCCGTTAAAGGAAATCATGCCGCCGCCA
AAGTCGAAGTCTGAGTAGTCGCTGAAATCTACCCACAATACCGCTTTG
CCCCATAGCGTGTGGAGATAACAGATGTCATAAGTAGTGTGTGTCATG
ATGGAACCGCGTCCGGAACCTGGATGTTGGCGGATGGCGTCAGCGTATGCAGG
CTGCAGTCTCAATGGTATCTCGATATTTCGCGTATTGGCGGAGCGC
CAGCTGCGCACCTGCCATGTCTATGTCAGAACGAGCGTTCACGGACAAGGTG
CCCGCGCCAAACCGAGCGGGAAATCCGGCATGTCGGAGTCGCTACGCCGAA
CTGAAGCGGAACAGCAGGGCTGCTGCCAGATCATGACGCCGGAGCTGG
ATGGCATGTTGGCGATGTTCCCGATAGGCAATGGTAA

フェレドキシン還元酵素(イタリック体)
フェレドキシン(下線)
開始コドンおよび終止コドンは太字

【図2E】

タンパク質配列
(上記DNA配列からExpasyを用いて翻訳)

配列番号 15 (CamAのアミノ酸配列 (422 個のアミノ酸残基))
M-N-A-N-I-N-A-M-V-T-G-L-A-S-H-E-V-A-E-C-L-P-A-S-S-O-N-E-C-N-D-L-V

MNANDINVNGVYDVEAVFGLGRASGEWNRIGLVRGDTATVPHPLPSKLXKAYLAG
KATAESLYRTTPDAYAQANQIOLLGQTVAINTRDRQVILSDGRALDYDRLVLTAG
GRPRPLPVASVGAVKANFRYLTLDEACIRRQLIADNRLVVIGGGYIGLEVAAT
AMAHAMVHTLTDARLERYTAPVPSAFCRQHAGWDRTGTQGVCGEMFSTD
QQKVTAVALCEDGTRPLDVAGLIPNCLEASAAGLQVGDQVINGVINEHMQTSDPLI
MAGDFCARFHQSOLDRWVRIESVPNALEQARKIAAILCGVKPDRDEAAPWFWSDQ
YEIIGKMLGLSEYQHDRIVRGLSAQZPDFSVFYLQGDRVLAVDTVRNPVEFNQSKQI
ITDRLPVGPVNLLGDESPLVKEIIAKAELSSA

配列番号1_6 (C a m Bのアミノ酸配列 (107個のアミノ酸残基))

MSKVVVVSHDGRRELDVADGVSLMQAAVNSGIYDIVGDCGGSASCATCHVYN
EAFTDKVPAANEREIGMLECVTAELKPNRSRLCCQIIMTPLELDGIVVDVPDRQW

配列番号23（ジェンスクリプト社によりNdeIおよびNotIを介してpET29a
プラスミドにサブクローニングされた切断型P450_{BM3}の合成DNA）

【図2F】

CCTCATGAGAACATCTGTATAAAGGAAGGCTTAAACAGCCCGAAAGCGAGG
CATTCATTACGCTCATACGGCTTCTCCTGCATGCCAAATCAGGCCAAAATCA
CGTTCAGCACGTAATGGAACAAGACGGCAAGAAAATGTGATTGACTCTTGATC
AAGGAGCGCCTTCTATTATGGCGTAGCGGAAAGCCAAATGGCTTCCGGCTCGGT
TGAACGCAACCGCTTATAGAACGCTTAGGCTGACCTTACCAAGTGGTAGCTGAGCAG
CTGCTCGCTGGTAGCTGCGACGAGCTAGAAGAAAAGGCCATACCCAAAGA
CGTGTGGCTGGTAAATGAGCCGCCG

終止コドンは太字
タンパク質配列
(上記DNA配列からE x p a s y を用いて翻訳)

GSQGSPSPTSEQSAKKVRKKAANAHPTPLVLVYQNSGMTAEGTARDLADIAMSK
GFAPQVATLDSHAGNLPREGAVLVTASYNGHPDPNAQKFVDWLQDQASADEVKG
VRYSVFCCGDKNWATTQYKQPVAFIDTELAAKGAEIENRGEADASDDFFGETYEE
WREHMWSVDAVYAFNLNDIENSENDKNTSLSTQLFVDSAADMPALMHKGAFSTNNVAS
KEILQPGSARSTRHLEIELPEKEASYQEGDHGLVPRNVEYGINVRARFGLDASO
QIRLEAEEELAKHLPLAKTVSVEELLLQYVLEOPDVTTRLRAAMAATCPVCKPHKVEL
EALLEKQAYKEOVLAKRRTLMLLEILKEYPACEMKCFSEJILLPSRPRYYSSISSPRV
DEKQASITVSVSWEAGSWSGYGEYKGIASNYLAELQEGDITTCIFSTPQSEFTLPKD
PETPLIMVGPTGVAPFRFGVQARQLKEQQGSQLGEAHLYFGCRSPRLLYDQE
ELENQASEGIIHTLFASTSMPNQPKTYVQHVMEMEQDKGKLIELLDQGAHYFICGDDG
QMAPATEVLMKSYADHVQSEADARLWLQLEKELGRYKARDVWAQ

配列番号25 (P450_{sub}1a1/CD9-BM3融合タンパク質のアミノ酸配列)

【図 2 G】

GGTCGACGAACTGCCGTTCAAGCACGATTGACGATCTACGGCCTCCACGCC
CTTCCGGTCACCGGGGGCGGAGCGCCGGCAGCGATCTCCCTCA
CCTACACTAACGACTCTGCTAAAAAAGTACGCAAAAGGAGAAAACGCTCA
TAATACGCGCTGCTTGTCTATAACGGTCAAATATGGAACAGCTGAAGGAA
CGCGCGCTGATTAGCAGATATTGCAATGAGCAAAGGATTGACCGCAGGT
CGCACGCTGATTACACGCCGAAATCTCCGCGCAGAGGAGCTGTATT
ATTGTAACGGCGCTTATAACGGTACCGTCAAGCAGGAAAGCTTGT
CGACTGGTAGACCAAGCAGCTGCTGTAGAAGTAAAGGGCTGCCTACTCC
GTATGGATGAAAGCTTGTGGCCTAAAGGGGAGAAAACATCGTGACCGC
GGTGAAGCAGATGCAAGCAGCAGCTTGAAGGCACATAGAAGAATGGCGT
AACACATGGAGTGGAGCTACAGTAGCAGCTTAACTCGACATTGAAACAGT
GAAGATAATAATCTACTCTTCAATTGCGACAGGCCGCCGATATG
CCGCTTGTGAAAGATGCAAGCTGTTCAAGCAGGAACTCGACAGCAAG
AACTTCAACAGCCAGGAGCTGCAACAGCAGGACATCTGAATTGAACCTT
CCAAAAGAAGCTTCTTATAAGAAGGAGATCATTTAGGTGTTATTCTCGAAC
TATGAAGGAATAGTAAACCGTAAAGCAGGAAAGGCTGGCGCTAGATGCATCACA
GCAAATCGCTGAAAGCAGAAAGAAAATTAGCTATTGCCCACCTCGCTA
AAACAGTATCCGTAAGAAGACGCTTCACTGAGGACGTTAGCAGGATCTCTT
ACGGCACGAGCTTCCGCAATGGCTGCTAAACGGCTCGCCGCCGATA
AAGTAGAGCTTGAAGCCTTGTGAAAAGCAAGCTACAAAGAACAGTGTG
GCAAAACGTTAACATGCTTGAAGGAAACTGGGAGCTGGTAAAGT
GAAATTAGCGAAATTATCGCCCTTCTGCCAACGATCACGCCGCCATTACT
CGATTCTTCTCATACCTCGCTGCTGAGTAAAGCAAGGAGCATCACGTCAGC
GTGCTCAGGAGAACGGCTGGAGCGGATATGGAGAATATAAAGGAATTGCGT
CGAACTATCTGCCAGCTGCAAGAAGGAGATACGATTACGTGCTTATTCC
ACACCGCAGTCAAGAATTACGCTGCCAACAGCCGCTTACATCAT
GGTCGAGCCGGAAACAGGGCTGCCGGTGTAGGGCTTGTGAGGCCG
CAAAACAGCTAAAGAACAGGAGACTGGAAAGCAGCATTAACTTC
GCTGGCTTACCTCATGAGACTATCTGTATCAAGAAGAGCTTGAACAGC
CAAAGCGAAGGCATCATTACGCTTACCGCTTTCTCGCATGCCAAATCA
GCCGAAACATACGCTTACGAGCTTAACTGGAAACAAGACGGCAAGAAATTGATTG
AACTTCTGATCAAGGAGGCTTCTATTTGCCAGACGGAAAGCCAATG
GCACCTGGCTGAGCAACGCTTATGAAAGCTATGCTGACGTTACCAAGT
GAGTGAGGAGACGCCCTCCCTATGGCTCAGCAGCTAGAAGAAAAGGCCGA
TACGCAAAGACGTGTTGGCTGGTAA

開始コドンおよび終止コドンは太字

タンパク質配列

(上記DNA配列からExPasyを用いて翻訳)

配列番号2_6 (AluC09_BM3のアミノ酸配列 (1004個のアミノ酸残基))

MTVEEATTATPLARKCPFSPPEYERLRRRESPVSRVGLPSQTAWALTRLEDIR
EMLSPPHFSSDRQSPSFPLVMARQIRREDKPFPRPSLIAMDPEHSRARRDVGEF
TVKRMKALQPRIQQIVDEHLLDLAGPKPADLVQALSLPVPSLVICELGPVPSDH
EFFQSCSRRMLSREVTAEERMTAEGLENYLDELVTKKEANATEDDLIGRQLIKQ
RETGEADHGELVGLAFILLIAGHETTANMISLGLTVLLENPDQLAKIKADPGKTAA
IEELLRVFTIAETATSRFAFADVEIGGTLIRAGEGVVGLSNAGNHDPPDFENPDFD
IERGARHHVAFGFVHQCLGQNLRLELQIVFDTLFRRVPGLRIAVPVDELPFKHD
STYGLHALPVTGGSGGGSGSIPSPSTEQSAKKVRKKA

10

20

30

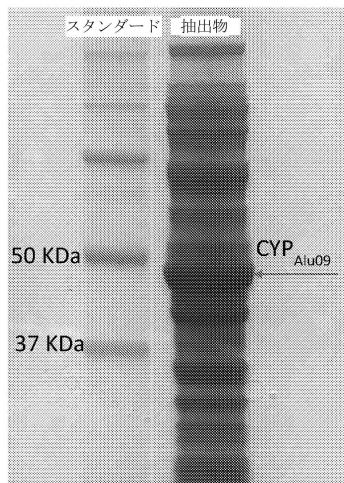
40

50

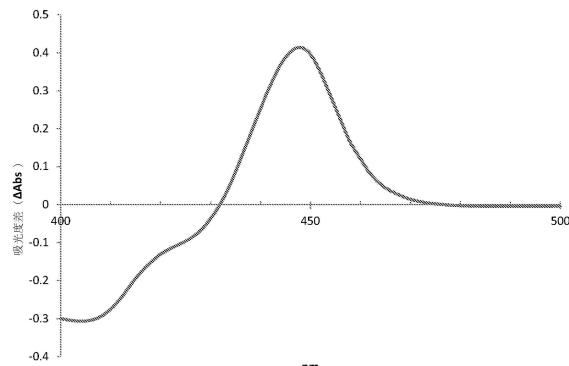
【図 2 H】

ENAHNTPLVLVYGSNMGTAEGLTARDLADIAMSKGFPQVATLD SHAGNL PREGA
VLVITASYNGHPDNAKQFVDWLQASADEVKVRYSVFGCGDKNWATTYQKV
PAFIDETLAAGAENIADRGEADASDDFEGTYEEWREHMWSDVAAYFNLDIENSE
DNKSTLSLQFDVDSAADMLAKMHGAFSTNNVASKELQQPGSARSTRHLIELPK
ASYQECDHILGVIPRNYEIGINVRVTARFGLDASQQIRLEAEEEKLHLPLAKTV
ELLQYVLEQDPVTRTQLRAMAATKVCPPHKVEALEALLEKQAYKEQVLAKRLT
MLE LLEKYPACEMKFSEFIALLPSIRPRYSISSSPRVEKQSITVSVSGEAWGGY
EYKGIAASNYLAELQEGDTITCFISTPQSEFTLPKDPETPLIMVGPGTVAPFRGFV
ARKQLKEQQQSLGEAHLYFGCRSPHEDLYQEELENAQSEGIIHTAFLSRMPNQ
PKTYVQHVMEDQGKKLIELLDQGAHFYICGDGSQ
MAPAVEATLMKSYADHVQSEADARLWLQQLEEKGRYAKDWWAG

【図 3】



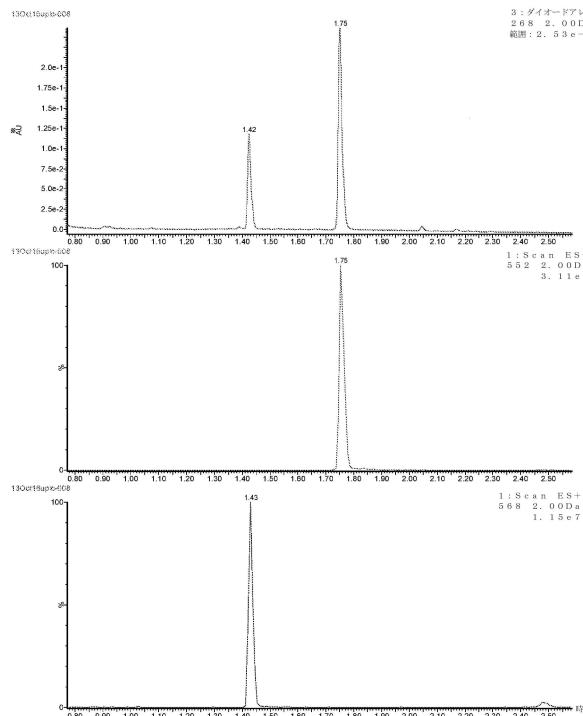
【図 4】



40

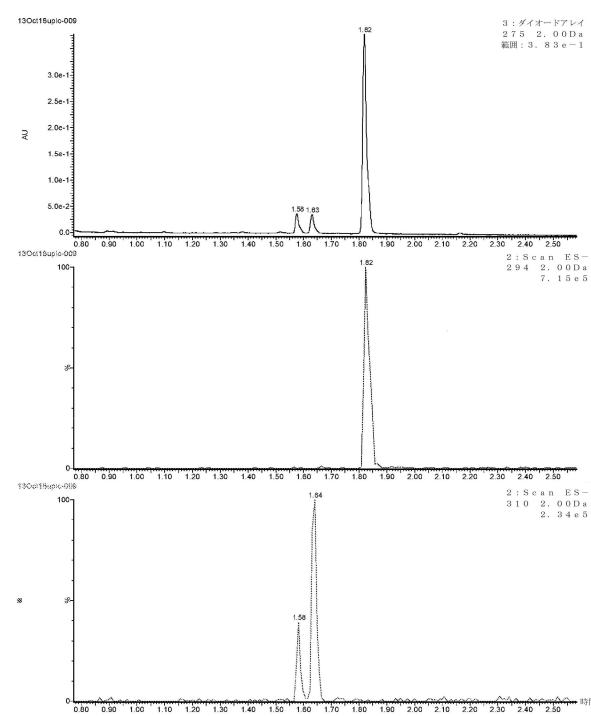
50

【図 5 A】



1.00 mg/Lのボセンタンを投与された、実施例7に記載の組換えP450_{14α}C909、フェレドキシソルフロボキシラーゼSCF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV268nm、EIC_{552m/z}（ボセンタン（1.75分））およびEIC_{568m/z}（ヒドロキシボセンタン（1.42分、親由来生成物のうちの収率は2.5%））である。

【図 5 B】



1.00 mg/Lのジクロフェナクを投与された、実施例7に記載の組換えP450_{14α}C909、フェレドキシソルフロボキシラーゼSCF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV214nm、EIC_{294m/z}（ジクロフェナク（1.82分））およびEIC_{310m/z}（ヒドロキシジクロフェナク生成物は、1.58分および1.64分に存在し、親由来生成物の、それぞれ7.4%および7.6%である）である。

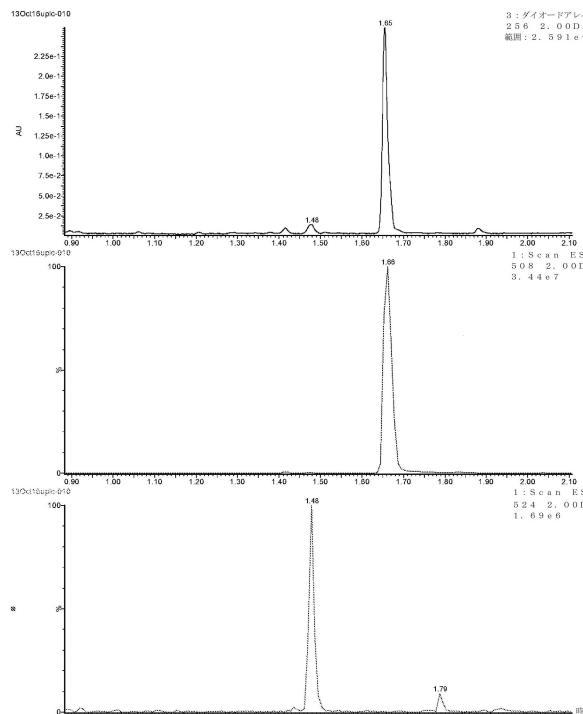
10

20

30

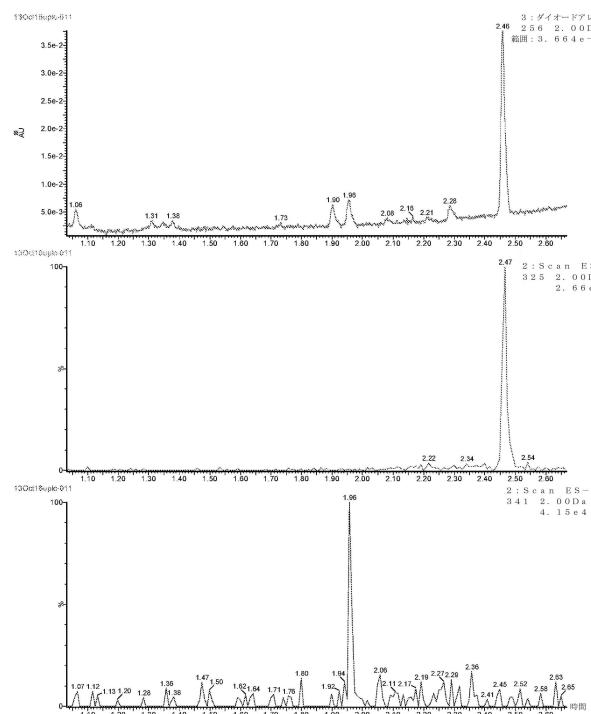
40

【図 5 C】



1.00 mg/LのエボチロンBを投与された、実施例7に記載の組換えP450_{14α}C909、フェレドキシソルフロボキシラーゼSCF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV275nm、EIC_{508m/z}（エボチロンB（1.48分））およびEIC_{524m/z}（ヒドロキシエボチロンB（1.88分、親由来生成物のうちの収率は2.5%））である。

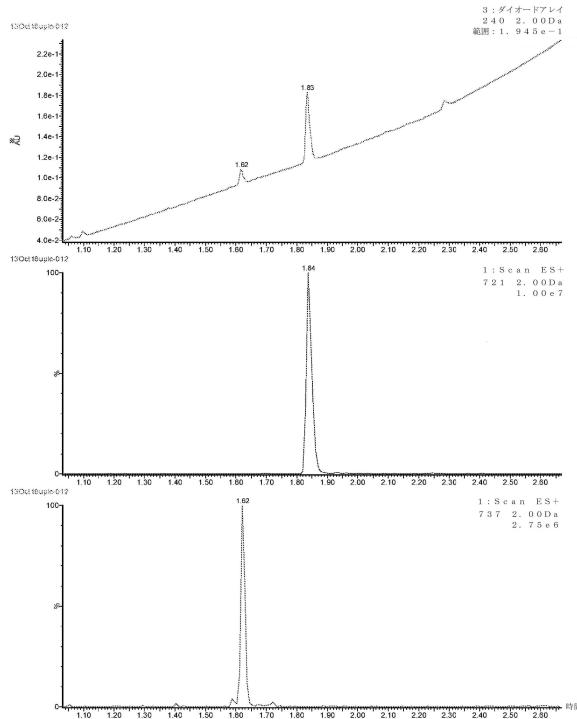
【図 5 D】



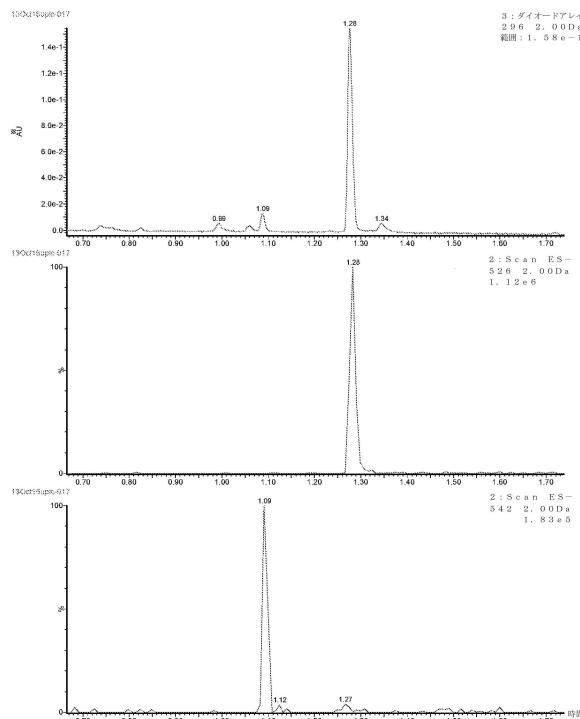
1.00 mg/Lのバブルバコンを投与された、実施例7に記載の組換えP450_{14α}C909、フェレドキシソルフロボキシラーゼSCF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV256nm、EIC_{508m/z}（バブルバコン（2.47分））およびEIC_{524m/z}（ヒドロキシバブルバコン（1.96分、親由来生成物のうちの収率は1.3%））である。

50

【図 5 E】



【図 5 F】



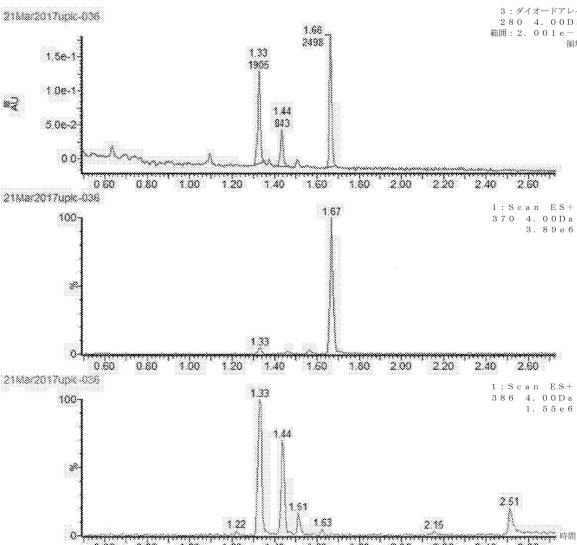
10

1.00 mg/Lのリトリナビル(処方HP-B-CD)を投与された。実施例7に記載の組換えP450_{11c}C9、フェレドキシン_{11c}F93およびフェレドキシン還元酵素_{11c}CF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV_{240nm}, EIC_{21m/z}(リトナビル(1. 84分)およびEIC_{237m/z}(ヒドロキシリトナビル(1. 62分、親由来生成物のうちの収率は15. 5%))である。

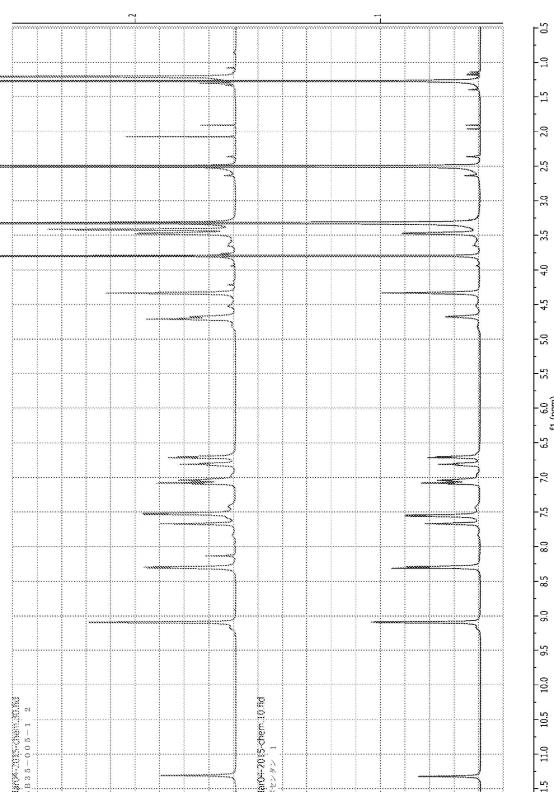
1.00 mg/LのB1R B796を投与された。実施例7に記載の組換えP450_{11c}C9、フェレドキシン_{11c}F93およびフェレドキシン還元酵素_{11c}CF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV_{266nm}, EIC_{526m/z}(B1R B796 (1. 28分))およびEIC_{542m/z}(ヒドロキシB1R B796 (1. 09分、親由来生成物のうちの収率は7. 4%))である。

20

【図 5 G】



【図 6】



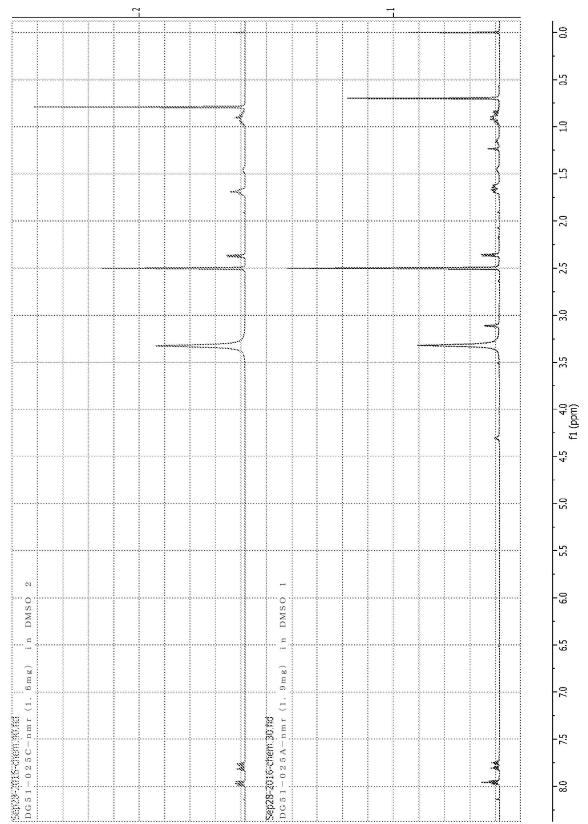
30

1.00 mg/Lのチパンチニブを投与された。実施例7に記載の組換えP450_{11c}C9、フェレドキシン_{11c}F93およびフェレドキシン還元酵素_{11c}CF15Aの凍結乾燥物質を用いた反応後抽出物のクロマトグラム。上段から下段に、UV_{280nm}, EIC_{210m/z}(チパンチニブ(1. 67分)およびEIC_{286m/z}(ヒドロキシ化チパンチニブ代謝産物(1. 33分(M4/M5), 1. 44分(M7)および1. 51分(M9)、親由来生成物のうちの全収率は52. 3%))である。

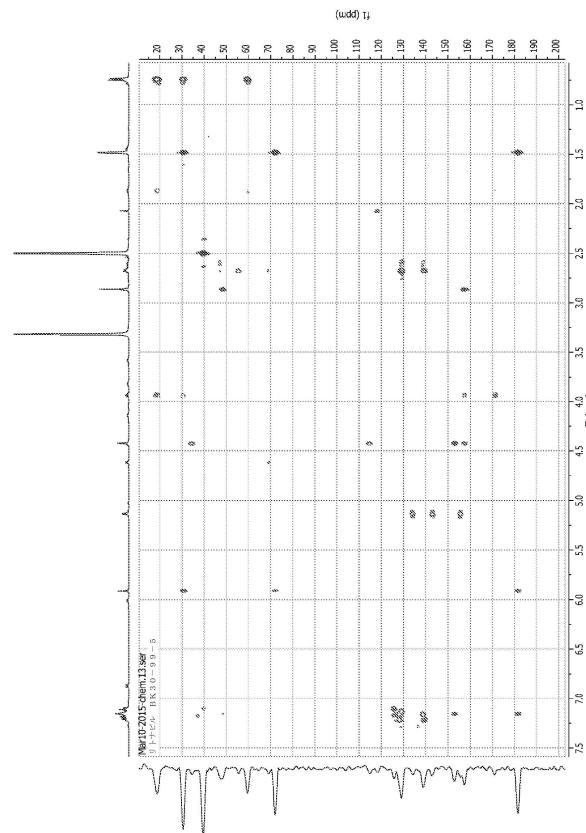
40

50

【図 7】



【図 8】



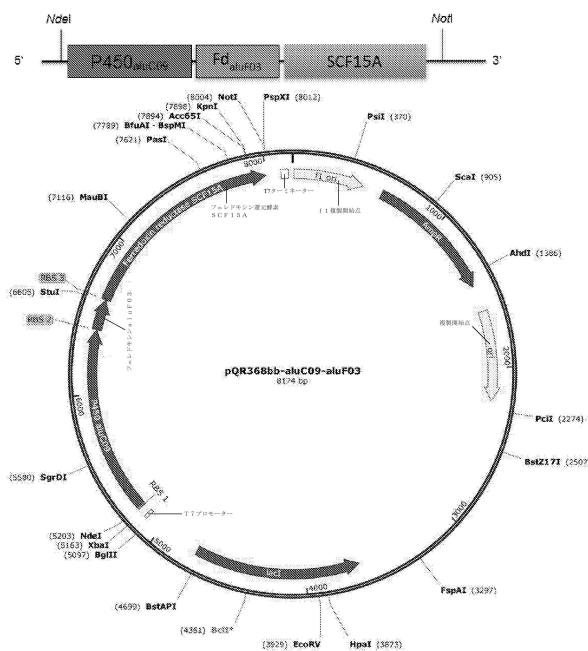
10

20

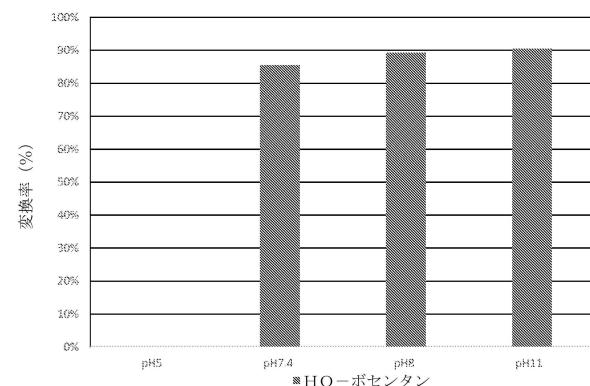
30

40

【図 9】

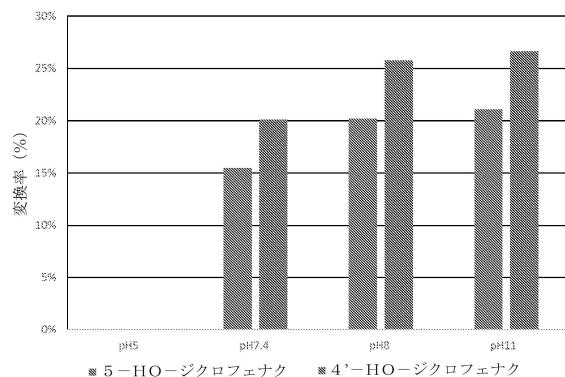


【図 10】

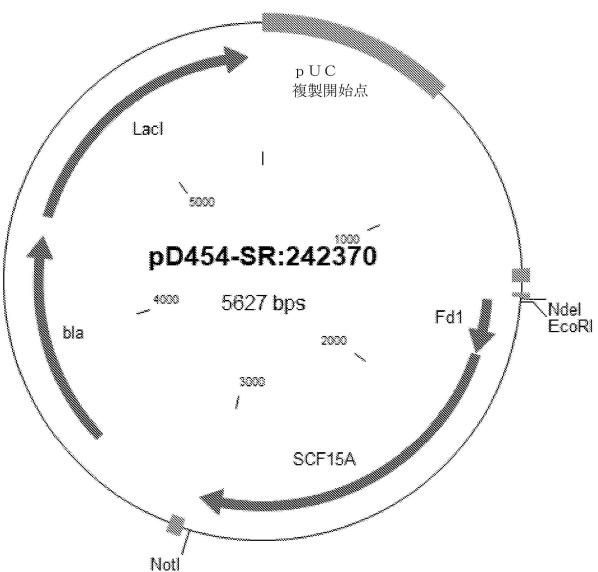


50

【図 1 1】

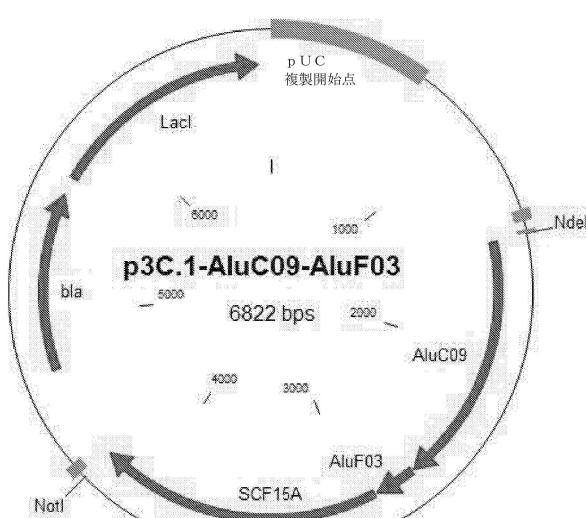


【図 1 2】



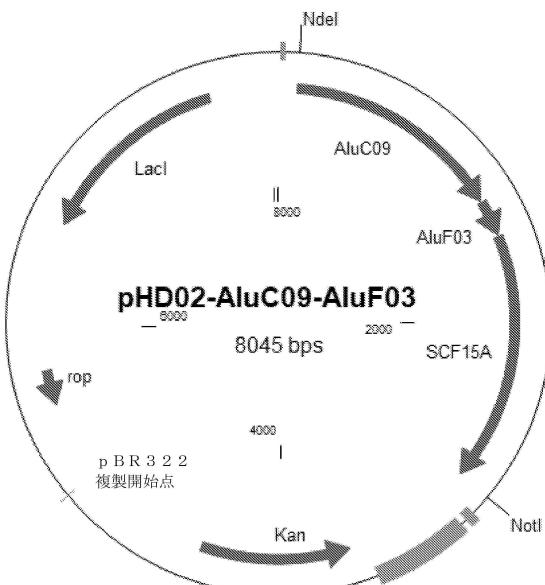
10

【図 1 3】



20

【図 1 4】

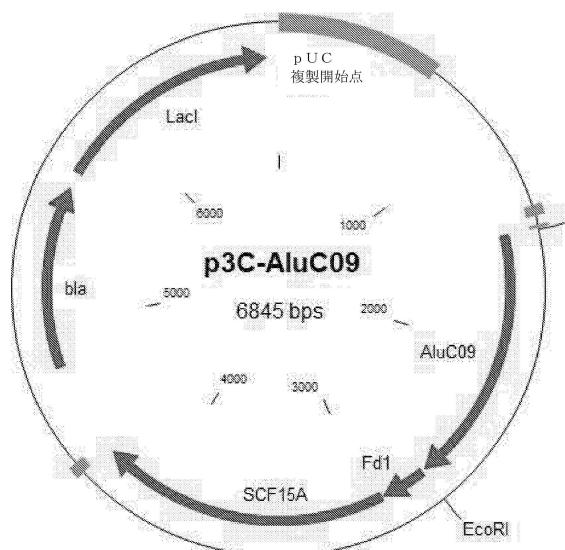


30

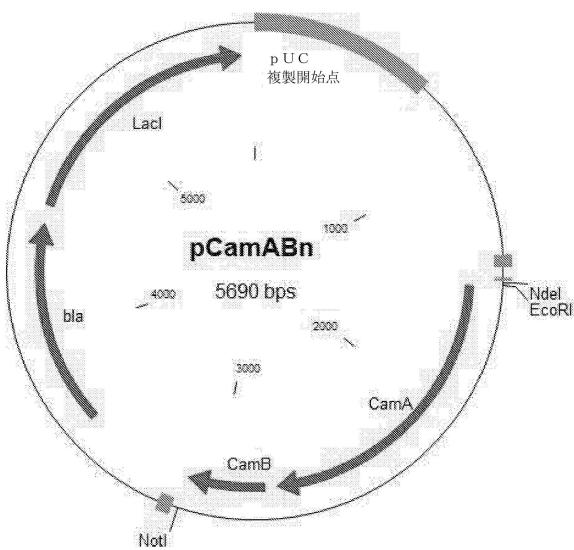
40

50

【図 15】

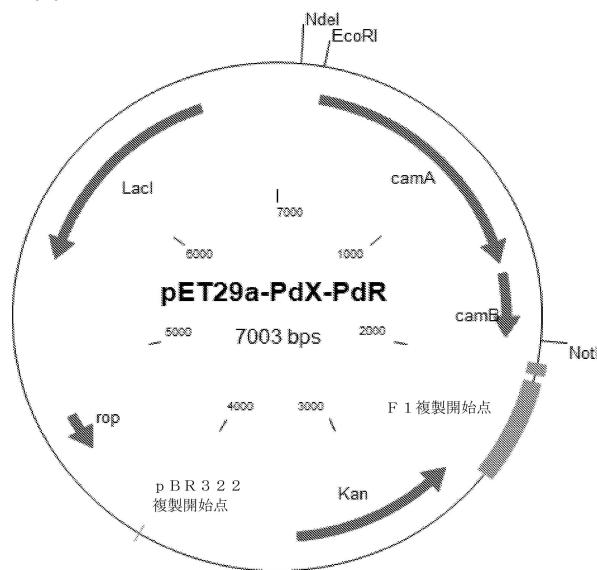


【図 16】

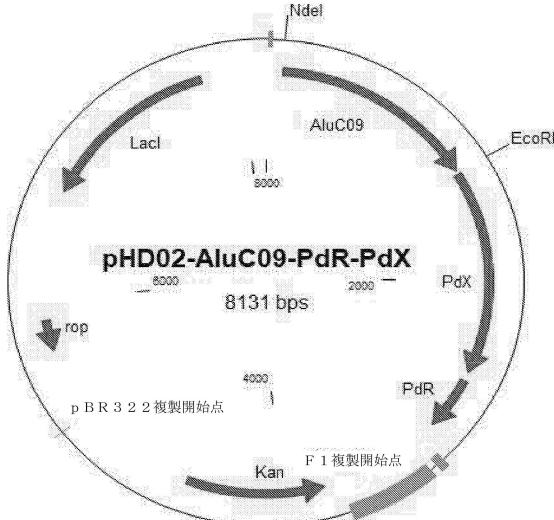


10

【図 17】



【図 18】



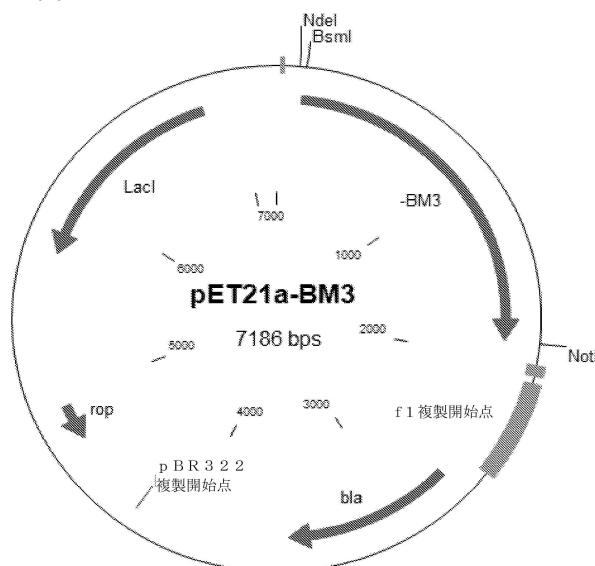
20

30

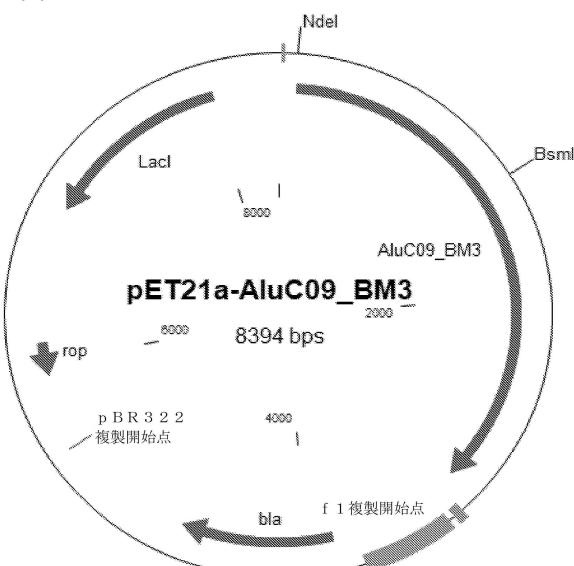
40

50

【図 19】



【図 20】



10

【配列表】

0007142813000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

アクセスブリッジ キングストン レーン ブルーネル サイエンス パーク ラッセル ビルディング
ハイファ ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 ウィリアムズ , ヘッドリー セント エドワード
カナダ オンタリオ エル1ゼット 2イー1 エイジャックス ホワイトフット クレセント 12

(72)発明者 フィップス , リチャード ケリー
イギリス ミドルセックス UB 8 3 PQ アクスブリッジ キングストン レーン ブルーネル サイエンス パーク ラッセル ビルディング ハイファ ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 リグリー , スティーブン キース
イギリス ミドルセックス UB 8 3 PQ アクスブリッジ キングストン レーン ブルーネル サイエンス パーク ラッセル ビルディング ハイファ ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 ニヤチコ , キンガ リンダ
イギリス ミドルセックス UB 8 3 PQ アクスブリッジ キングストン レーン ブルーネル サイエンス パーク ラッセル ビルディング ハイファ ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 ブーン , ピンセント
イギリス ミドルセックス UB 8 3 PQ アクスブリッジ キングストン レーン ブルーネル サイエンス パーク ラッセル ビルディング ハイファ ディスカバリー リミテッド内

(72)発明者 シュルツ , セバスチャン
ドイツ 0 1 1 5 9 ドレスデン ラーベナウアー シュトラーセ 19 ダブリュイー1 ツインマー2

(72)発明者 ワード , ジョン マキシム
イギリス グレーター ロンドン WC 1 E 6 B T ロンドン ガワー ストリート バーナード カツ ビルディング ユニバーシティ カレッジ ロンドン デパートメント オブ バイオケミカル エンジニアリング ザ アドバンスド センター フォー バイオケミカル エンジニアリング

審査官 福澤 洋光

(56)参考文献 特表2006 - 510386 (JP, A)
特表2005 - 514031 (JP, A)
国際公開第2004 / 078978 (WO, A1)
米国特許出願公開第2014 / 0038850 (US, A1)
Definition: cytochrome P450 [Amycolatopsis lirida NRRL 2430]., Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.KFU83201, 2014年09月05日, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/KFU83201>

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)
C 12 N 1 / 00 - 15 / 90
C 12 P 1 / 00 - 41 / 00
CA / MEDLINE / BIOSIS (STN)
J STPplus / JMEDplus / J ST7580 (JDreamIII)
Genbank / EMBL / DDBJ / GeneSeq
UniProt / GeneSeq
PubMed