



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119654416 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 18

(21) 申请号 202380050059.9	(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限 责任公司 11219 专利代理师 鲁雯雯 金龙河
(22) 申请日 2023.06.29	
(30) 优先权数据 2022-106294 2022.06.30 JP	(51) Int.Cl. C12N 15/54 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01) C12N 15/53 (2006.01) C12N 9/10 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2024.12.26	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2023/024236 2023.06.29	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02024/005155 JA 2024.01.04	
(71) 申请人 麒麟控股株式会社 地址 日本 申请人 协和发酵生化株式会社	
(72) 发明人 合田明日香 山下诚 绫纈健人 青木山本祐梨子 渡边太郎	权利要求书3页 说明书46页 序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称
4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法

(57) 摘要
一个实施方式的制造方法为用于由1,4-双(氨甲基)环己烷制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法,其包括使用由与序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上的一致性的氨基酸序列构成且具有氨基转移活性的蛋白质、以及由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成且具有醛脱氢酶活性的蛋白质的步骤。

1. 一种蛋白质,其具有使1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移至其它化合物而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的氨基转移活性,并且由与序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上的一致性的氨基酸序列构成。

2. 一种DNA,其编码权利要求1所述的蛋白质。

3. 一种重组体DNA,其含有权利要求2所述的DNA。

4. 一种重组细胞,其含有权利要求2所述的DNA,或者通过用权利要求3所述的重组体DNA转化宿主细胞而得到。

5. 一种蛋白质,其具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性,并且由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成。

6. 一种蛋白质,其具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性,并且由与序列号19~22和35~46中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上的一致性的氨基酸序列构成。

7. 一种DNA,其编码权利要求6所述的蛋白质。

8. 一种重组体DNA,其含有权利要求7所述的DNA。

9. 一种重组细胞,其含有权利要求7所述的DNA,或者通过用权利要求8所述的重组体DNA转化宿主细胞而得到。

10. 一种用于由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造顺式体和/或反式体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法,其包括:

(i) 在氨基转移酶存在下由1,4-双(氨甲基)环己烷制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的步骤;以及

(ii) 在醛脱氢酶存在下由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的步骤。

11. 根据权利要求10所述的制造方法,其中,所述氨基转移酶为权利要求1所述的蛋白质,所述醛脱氢酶为权利要求6所述的蛋白质。

12. 根据权利要求10或11所述的制造方法,其中,在所述方法的一部分或全部中使丙氨酸脱氢酶和/或NADH氧化酶共存。

13. 根据权利要求10或11所述的制造方法,其中,由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

14. 根据权利要求10或11所述的制造方法,其中,由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造顺式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

15. 根据权利要求10或11所述的制造方法,其中,所述方法的一部分或全部在中性或碱性条件下进行。

16. 根据权利要求15所述的制造方法,其中,所述方法的一部分或全部在仲胺存在下进行。

17. 一种蛋白质,其为醛脱氢酶,具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性。

18. 根据权利要求17所述的蛋白质,其为苯甲醛脱氢酶,具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性。

19. 根据权利要求17所述的蛋白质, 其中, 所述醛脱氢酶为假单胞菌 (*Pseudomonas*) 属细菌来源的醛脱氢酶。

20. 根据权利要求17所述的蛋白质, 其由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成。

21. 一种蛋白质, 其具有由4-(氨甲基) 环己烷-1-甲醛产生4-(氨甲基) 环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性, 由与序列号20所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性且在与序列号20所示的氨基酸序列比对时含有下述[1]~[26]中的至少一个氨基酸基的氨基酸序列构成,

- [1] 与第35位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基 (G),
- [2] 与第65位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基 (A),
- [3] 与第82位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基 (L),
- [4] 与第104位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基 (G),
- [5] 与第109位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基 (G),
- [6] 与第110位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基 (I),
- [7] 与第117位对应的位置的氨基酸残基为谷氨酰胺残基 (Q),
- [8] 与第122位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基 (A),
- [9] 与第124位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基 (L),
- [10] 与第134位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基 (V),
- [11] 与第144位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基 (V),
- [12] 与第160位对应的位置的氨基酸残基为苯丙氨酸残基 (F),
- [13] 与第271位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基 (G),
- [14] 与第290位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基 (A),
- [15] 与第319位对应的位置的氨基酸残基为天冬氨酸残基 (D),
- [16] 与第333位对应的位置的氨基酸残基为天冬氨酸残基 (D),
- [17] 与第365位对应的位置的氨基酸残基为谷氨酰胺残基 (Q),
- [18] 与第390位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基 (I),
- [19] 与第420位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基 (A),
- [20] 与第423位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基 (L),
- [21] 与第434位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基 (V),
- [22] 与第440位对应的位置的氨基酸残基为脯氨酸残基 (P),
- [23] 与第443位对应的位置的氨基酸残基为半胱氨酸残基 (C),
- [24] 与第445位对应的位置的氨基酸残基为脯氨酸残基 (P),
- [25] 与第466位对应的位置的氨基酸残基为丝氨酸残基 (S),
- [26] 与第467位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基 (I)。

22. 一种DNA, 其编码权利要求5和17~21中任一项所述的蛋白质。

23. 一种重组体DNA, 其含有权利要求22所述的DNA。

24. 一种重组细胞, 其含有权利要求22所述的DNA。

25. 一种重组细胞, 其通过用权利要求23所述的重组体DNA转化宿主细胞而得到。

26. 根据权利要求10所述的制造方法, 其中, 所述氨基转移酶为权利要求1所述的蛋白质, 所述醛脱氢酶为权利要求5和17~21中任一项所述的蛋白质。

27. 根据权利要求26所述的制造方法, 其中, 在所述方法的一部分或全部中使丙氨酸脱氢酶和/或NADH氧化酶共存。

28. 根据权利要求26所述的制造方法, 其中, 由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

29. 根据权利要求26所述的制造方法, 其中, 由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造顺式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

30. 根据权利要求26所述的制造方法, 其中, 所述方法的一部分或全部在中性或碱性条件下进行。

31. 根据权利要求26所述的制造方法, 其中, 所述方法的一部分或全部在仲胺存在下进行。

4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法

技术领域

[0001] 本发明涉及在4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造中使用的蛋白质以及使用该蛋白质的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法。另外,本发明涉及高效的反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法。

背景技术

[0002] 4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸(4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid; AMCHA)是作为纤溶酶抑制剂开发的人工合成氨基酸(非专利文献1)。AMCHA中存在顺式型和反式型的立体异构体。其中,非专利文献2确认了反式型具有纤溶酶抑制作用。作为反式型的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式-4-氨甲基环己烷-1-甲酸(t-AMCHA)也被称为氨甲环酸(Tranexamic acid; TXA),由于其纤溶酶抑制作用,因而可作为止血剂、抗炎剂用于出血的预防和治疗(非专利文献3~4)。

[0003] 作为4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法,已知主要有化学合成法。例如,专利文献1中公开了通过以4-(氯甲基)苯甲酸作为起始底物、经过氨基化反应和氢化反应而生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸、接着异构化反应这3步化学合成反应来制造反式体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的方法。

[0004] 包括上述的化学合成法需要在高温和高压下反应,存在能源成本高、环境负荷也重的问题。

[0005] 作为化学合成法的替代,可列举利用微生物的制造方法。专利文献2中公开了使属于棒杆菌属或诺卡菌属的微生物与1,4-双(氨甲基)-环己烷的顺式体和反式体的混合物接触来制造反式体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的方法。但是,该方法是使用从自然界分离出的微生物本身的转化反应,因此,4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率低,而且也没有进行活性主体的酶的鉴定。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献1:CN114014768A

[0009] 专利文献2:日本特开昭63-152991号公报

[0010] 非专利文献

[0011] 非专利文献1:Keio Journal of Medicine(1962)11,8,105-115

[0012] 非专利文献2:Keio Journal of Medicine(1964)18,4,177-185

[0013] 非专利文献3:European Journal of Haematology(2020)104,2,79-87

[0014] 非专利文献4:Journal of Trauma and Acute Care Surgery(2019)86,1,101-107

发明内容

[0015] 发明要解决的问题

[0016] 本发明的目的在于,提供以1,4-双(氨甲基)环己烷作为底物基于酶反应制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的方法以及可用于该酶反应的微生物来源的蛋白质。

[0017] 用于解决问题的方法

[0018] 截至目前为止,还不了解由1,4-双(氨甲基)环己烷生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反应途径。因此,本发明人设想了利用氨基转移酶和醛脱氢酶的两步酶反应途径,并分别筛选了可能具有目标活性的蛋白质。发现通过在大肠杆菌菌株中表达该蛋白质并进行纯化、实施酶反应,能够由1,4-双(氨甲基)环己烷生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸,从而完成了本发明。

[0019] 本发明例如涉及以下的各发明。

[0020] [1]一种蛋白质,其具有使1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移至其它化合物而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的氨基转移活性,并且由与序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上的一致性的氨基酸序列构成。

[0021] [2]一种DNA,其编码[1]所述的蛋白质。

[0022] [3]一种重组体DNA,其含有[2]所述的DNA。

[0023] [4]一种重组细胞,其含有[2]所述的DNA,或者通过用[3]所述的重组体DNA转化宿主细胞而得到。

[0024] [5]一种蛋白质,其具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性,并且由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成。

[0025] [6]一种蛋白质,其具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性,并且由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上的一致性的氨基酸序列构成。

[0026] [7]一种DNA,其编码[5]或[6]所述的蛋白质。

[0027] [8]一种重组体DNA,其含有[7]所述的DNA。

[0028] [9]一种重组细胞,其含有[7]所述的DNA,或者通过用[8]所述的重组体DNA转化宿主细胞而得到。

[0029] [10]一种用于由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造顺式体和/或反式体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法,其包括:

[0030] (i)在氨基转移酶存在下由1,4-双(氨甲基)环己烷制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的步骤;以及

[0031] (ii)在醛脱氢酶存在下由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的步骤。

[0032] [11]根据[10]所述的制造方法,其中,上述氨基转移酶为[1]所述的蛋白质,上述醛脱氢酶为[5]或[6]所述的蛋白质。

[0033] [12]根据[10]或[11]所述的制造方法,其中,包括在上述方法的一部分或全部中使丙氨酸脱氢酶和/或NADH氧化酶共存的步骤。

[0034] [13]根据[10]~[12]中任一项所述的制造方法,其中,由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷制造反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

[0035] [14]根据[10]~[12]中任一项所述的制造方法,其中,由顺式体和/或反式体的1,

4-双(氨甲基)环己烷制造顺式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

[0036] [15]根据[10]~[13]中任一项所述的制造方法,其中,上述方法的一部分或全部在中性或碱性条件下进行。

[0037] [16]根据[15]所述的制造方法,其中,上述方法的一部分或全部在仲胺存在下进行。

[0038] [17]一种蛋白质,其为醛脱氢酶,具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性。

[0039] [18]根据[17]所述的蛋白质,其为苯甲醛脱氢酶,具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性。

[0040] [19]根据[17]或[18]所述的蛋白质,其中,上述醛脱氢酶为假单胞菌属细菌来源的醛脱氢酶。

[0041] [20]根据[17]或[18]所述的蛋白质,其由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成。

[0042] [21]一种蛋白质,其具有由4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性,由与序列号20所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性且在与序列号20所示的氨基酸序列比对时含有下述(1)~(26)中的至少一个氨基酸基的氨基酸序列构成。

[0043] (1)与第35位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0044] (2)与第65位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0045] (3)与第82位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基(L)

[0046] (4)与第104位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0047] (5)与第109位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0048] (6)与第110位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基(I)

[0049] (7)与第117位对应的位置的氨基酸残基为谷氨酰胺残基(Q)

[0050] (8)与第122位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0051] (9)与第124位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基(L)

[0052] (10)与第134位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基(V)

[0053] (11)与第144位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基(V)

[0054] (12)与第160位对应的位置的氨基酸残基为苯丙氨酸残基(F)

[0055] (13)与第271位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0056] (14)与第290位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0057] (15)与第319位对应的位置的氨基酸残基为天冬氨酸残基(D)

[0058] (16)与第333位对应的位置的氨基酸残基为天冬氨酸残基(D)

[0059] (17)与第365位对应的位置的氨基酸残基为谷氨酰胺残基(Q)

[0060] (18)与第390位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基(I)

[0061] (19)与第420位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0062] (20)与第423位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基(L)

[0063] (21)与第434位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基(V)

[0064] (22)与第440位对应的位置的氨基酸残基为脯氨酸残基(P)

- [0065] (23) 与第443位对应的位置的氨基酸残基为半胱氨酸残基(C)
- [0066] (24) 与第445位对应的位置的氨基酸残基为脯氨酸残基(P)
- [0067] (25) 与第466位对应的位置的氨基酸残基为丝氨酸残基(S)
- [0068] (26) 与第467位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基(I)
- [0069] [22] 一种DNA,其编码[17] ~ [21]中任一项所述的蛋白质。
- [0070] [23] 一种重组体DNA,其含有[22]所述的DNA。
- [0071] [24] 一种重组细胞,其含有[22]所述的DNA,或者通过用[23]所述的重组体DNA转化宿主细胞而得到。
- [0072] [25] 根据[10]所述的制造方法,其中,上述氨基转移酶为[1]所述的蛋白质,上述醛脱氢酶为[17] ~ [21]中任一项所述的蛋白质。
- [0073] [26] 根据[25]所述的制造方法,其中,在上述方法的一部分或全部中使丙氨酸脱氢酶和/或NADH氧化酶共存。
- [0074] [27] 根据[25]或[26]所述的制造方法,其中,由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨基)环己烷制造反式-4-(氨基)环己烷-1-甲酸。
- [0075] [28] 根据[25]或[26]所述的制造方法,其中,由顺式体和/或反式体的1,4-双(氨基)环己烷制造顺式-4-(氨基)环己烷-1-甲酸。
- [0076] [29] 根据[25] ~ [28]中任一项所述的制造方法,其中,上述方法的一部分或全部在中性或碱性条件下进行。
- [0077] [30] 根据[25] ~ [28]中任一项所述的制造方法,其中,上述方法的一部分或全部在仲胺存在下进行。
- [0078] 发明效果
- [0079] 根据本发明的具有氨基转移活性的蛋白质和具有醛脱氢酶活性的蛋白质,可以使用1,4-双(氨基)环己烷底物制造4-(氨基)环己烷-1-甲酸。另外,通过根据作为目标的4-(氨基)环己烷-1-甲酸的立体结构有效地利用具有醛脱氢酶活性的蛋白质的底物特异性,即使在使用顺式体和反式体的混合物作为底物的情况下也能够选择性地使目标结构的化合物大量生成。
- [0080] 根据本发明的制造方法,能够在不需要高温高压且制造成本降低的情况下高效地制造4-(氨基)环己烷-1-甲酸。另外,通过向反应体系中导入酮酸和/或辅酶或者它们的再生系统,能够使酶反应更高效,从而能够提高4-(氨基)环己烷-1-甲酸的生产率。而且,在使用1,4-双(氨基)环己烷的顺式体和反式体的混合物作为底物的情况下,通过使用选择性地作用于反式体的4-(氨基)环己烷-1-甲醛的本发明的醛脱氢酶并且使反应在中性或碱性条件下进行,能够促进作为中间体的4-(氨基)环己烷-1-甲醛的顺式体向反式体的异构化反应,因此能够利用动态动力学拆分高收率且高选择性地制造反式体的4-(氨基)环己烷-甲酸(氨基环酸)。

附图说明

[0081] 图1示出一个实施方式的由顺式体或反式体的1,4-双(氨基)环己烷制造顺式体或反式体的4-(氨基)环己烷-1-甲醛以及顺式体或反式体的4-(氨基)环己烷-1-甲酸的方案。

[0082] 图2为示出实施例1的氨基转移酶(AT)表达质粒(pQE80L-PpAT8)的构建方法的示意图。

[0083] 图3示出实施例1中的PatA酶反应液的LC-MS色谱图(EIC:142.10m/z)。

[0084] 图4为示出实施例7中的AT和醛脱氢酶(ALDH)共表达质粒(pET28a-PatA-XylC)的构建方法的示意图。

[0085] 图5A为示出实施例11中的醛脱氢酶的氨基酸序列的比对结果的图。

[0086] 图5B为示出实施例11中的醛脱氢酶的氨基酸序列的比对结果的图。

具体实施方式

[0087] 1. 化合物和酶反应

[0088] 作为本发明的目标化合物的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸(4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid;以下有时称为“AMCHA”)为非天然型的氨基酸。4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸中存在作为顺式体的顺式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸(cis-4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid)和作为反式体的反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸(trans-4-(aminomethyl)cyclohexanecarboxylic acid)。其中,反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸也被称为氨甲环酸(Tranexamic acid;以下有时称为“TXA”)。本说明书中,只要没有特别声明,则“氨甲环酸”或“TXA”是指反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸,顺式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸则称为顺式-氨甲环酸或顺式-TXA。

[0089] 本发明中的酶反应如以下所示包括两步反应。第1步(步骤(i))中,作为底物化合物的1,4-双(氨甲基)环己烷(1,4-bis(aminomethyl)cyclohexane)与作为能够提供羰基的化合物的酮酸(例如丙酮酸)反应,通过氨基转移酶(AT)转化为作为中间体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛(4-(aminomethyl)cyclohexane-1-carbaldehyde)和接受了氨基的化合物(使用丙酮酸作为酮酸的情况下为丙氨酸)。第2步(步骤(ii))中,中间体4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛通过以NAD(P)⁺为辅酶的醛脱氢酶(ALDH)而转化为4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸和NAD(P)H(图1)。

[0090] 另外,在第1步中使用丙酮酸作为用于提供羰基的化合物时,产生的丙氨酸可通过丙氨酸脱氢酶转化(再生)为丙酮酸,在第2步中,产生的NAD(P)H可通过NAD(P)H氧化酶而转化(再生)为NAD(P)⁺。此外,也可以通过将NAD(P)H电化学氧化而使NAD(P)⁺再生(图1)。

[0091] 底物化合物1,4-双(氨甲基)环己烷可以为顺式体和反式体的混合物,可以为反式体,也可以为顺式体。中间体4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛同样可以为顺式体和反式体的混合物,可以为反式体,也可以为顺式体。

[0092] 2. 本发明的蛋白质和DNA

[0093] (1) 本发明的氨基转移酶和编码其的DNA

[0094] 氨基转移酶(也记作转氨酶、aminotransferase、AT或转氨基酶、transaminase)是生物化学中催化氨基酸与 α -酮酸之间的反应的酶的总称。本说明书中,具有氨基转移活性是指催化将氨基从具有氨基的化合物转移到其它化合物而转化为羰基的反应的活性。

[0095] 本发明的具有氨基转移活性的蛋白质是具有使1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移到其它化合物而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的活性的蛋白质。即,是具有介导由1,4-双(氨甲基)环己烷向4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的反应的活性的蛋白质,具体而言,是具有

从1,4-双(氨甲基)环己烷中除去氨基而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的活性的蛋白质。本说明书中,这些蛋白质统称为“本发明的氨基转移酶”或“本发明的AT”。

[0096] 一个实施方式的AT例如为由与序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上(优选为70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性的氨基酸序列构成并且具有氨基转移活性的蛋白质。

[0097] 本实施方式的AT为由序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质。具有序列号1所示的氨基酸序列的蛋白质为恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)KT2440来源的氨基转移酶PpAT8,具有序列号2所示的氨基酸序列的蛋白质为恶臭假单胞菌KT2440来源的氨基转移酶PpAT2,具有序列号3所示的氨基酸序列的蛋白质为杀鲑气单胞菌杀鲑亚种(*Aeromonas salmonicida* subsp.*Salmonicida*)来源的氨基转移酶AsAT5,具有序列号4所示的氨基酸序列的蛋白质为大肠杆菌(*Escherichia coli*)K12 MG1655来源的氨基转移酶PatA。由序列号103~105所示的氨基酸序列构成的蛋白质为表3中记载的微生物来源的、由序列号1或4所示的氨基酸序列构成的蛋白质(PpAT8或PatA)的同源蛋白(homologous protein)。到目前为止尚不知晓这些蛋白质具有使1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移至其它化合物而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的活性。

[0098] 另一实施方式的AT为由上述序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的突变蛋白或同源蛋白,是由与序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上(优选为70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性的氨基酸序列构成并且具有氨基转移活性的蛋白质。

[0099] 本说明书中,突变蛋白是指使作为基础的蛋白质中的氨基酸残基人为地缺失或置换、或者在该蛋白质中人为地插入或添加氨基酸残基而得到的蛋白质。本说明书中,同源蛋白是指自然界中存在的生物所具有的蛋白质,是进化上的起源来源于同一蛋白质的一组蛋白质。同源蛋白彼此之间结构和功能是相似的。

[0100] 突变蛋白中,氨基酸的缺失、置换、插入或添加可以是在氨基酸序列中的任意位置处缺失、置换、插入或添加1~20个氨基酸,例如可以是缺失、置换、插入或添加1~15个、1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个氨基酸。

[0101] 置换、插入或添加的氨基酸为天然型和非天然型均可。作为天然型氨基酸,可列举L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-精氨酸、L-甲硫氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-半胱氨酸等。

[0102] 以下示出可以相互置换的氨基酸的例子。同一组中包含的氨基酸可以相互置换。

[0103] A组:亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、甲硫氨酸、邻甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸

[0104] B组:天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己二酸、2-氨基辛二酸

[0105] C组:天冬酰胺、谷氨酰胺

[0106] D组:赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙酸

[0107] E组:脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸

[0108] F组:丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸

[0109] G组:苯丙氨酸、酪氨酸

[0110] 由序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的突变蛋白或同源蛋白的氨基酸序列相对于序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有至少60%以上、优选70%以上、75%以上、80%以上、90%以上或93%以上、进一步优选95%以上、最优选98%以上的一致性。

[0111] 氨基酸序列、碱基序列的一致性(也称为同源性)可以使用由Karlin和Altschul开发的算法BLAST[Pro.Nat.Acad.Sci.USA, 90, 5873 (1993)]、FASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]来确定。基于该算法BLAST开发了被称为BLASTN、BLASTX的程序[J.Mol.Biol., 215, 403 (1990)]。基于BLAST使用BLASTN分析碱基序列时,参数例如设为Score=100、wordlength=12。另外,基于BLAST使用BLASTX分析氨基酸序列时,参数例如设为score=50、wordlength=3。使用BLAST和Gap ped BLAST程序时,使用各程序的默认参数。这些分析方法的具体手段是公知的。

[0112] 具有氨基转移活性这一点例如可以通过以下方法来确认。首先,通过后述的方法制作含有编码要确认上述活性的蛋白质的DNA的重组体DNA。然后,用该重组体DNA转化大肠杆菌等微生物并培养所得到的微生物,向该培养基中添加1,4-双(氨甲基)环己烷和丙酮酸,使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成。最后,使用利用HPLC等的常规分析方法检测菌体内、培养上清中的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛,由此可以确认对象蛋白质具有氨基转移活性。

[0113] 一个实施方式的编码AT的DNA为编码由与序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列具有60%以上(优选为70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性的氨基酸序列构成并且具有氨基转移活性的蛋白质的DNA。本说明书中,DNA可以为基因,也可以为基因的一部分。

[0114] 本实施方式的编码AT的DNA为编码由序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的碱基序列,作为其一例,可列举由序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列构成的DNA。

[0115] 另一实施方式的编码AT的DNA为编码由序列号1~4和103~105中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的突变蛋白或同源蛋白的DNA。编码突变蛋白或同源蛋白的DNA可以在序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列的任意位置处缺失、置换、插入或添加1~50个碱基,例如,可以缺失、置换、插入或添加1~40个、1~30个、1~25个、1~20个、1~15个、1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个碱基。另外,编码突变蛋白或同源蛋白的DNA优选由与序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列具有至少60%以上、优选70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上或93%以上、进一步优选95%以上、最优选98%以上的一致性的碱基序列构成,更优选由序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列构成。

[0116] 由序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列构成的DNA或编码序列已知的同源蛋白的DNA可以以基因组DNA为模板使用合适的引物通过PCR进行扩增。此时,引物的末端可以含有限制酶位点等用于克隆到表达载体中的DNA序列。对于同源蛋白,还可以基于检索而设计探针或引物,使用具有该DNA的微生物获得编码同源蛋白的DNA。编码突变蛋白的DNA可以通过易错PCR、利用PCR的定点突变法或市售的定点突变试剂盒等来获得。此外,一个实施方式的编码AT的DNA也可以通过基于已确定的DNA的碱基序列使用日本TECHNO SERVICE公司制NTS M系列DNA合成装置等进行化学合成来制备目标DNA。

[0117] 在此,也可以通过以成为最适合在宿主细胞中表达的密码子的方式对一个实施方式的DNA进行碱基置换来提高该DNA所编码的蛋白质的表达量。宿主细胞中的密码子使用频率的信息可以通过公共数据库获得。

[0118] 一个实施方式的编码AT的DNA还可以为与由序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列的互补碱基序列构成的DNA在严谨条件下杂交的DNA。杂交是指DNA与具有特定的碱基序列的DNA或该DNA的一部分进行杂交的步骤。因此,与该具有特定的碱基序列的DNA或该DNA的一部分进行杂交的DNA的碱基序列可以为作为Northern或Southern印迹分析的探针有用、或者能够作为PCR分析的寡核苷酸引物使用的长度的DNA。

[0119] 作为用作探针的DNA,可列举至少100个碱基以上、优选200个碱基以上、更优选500个碱基以上的DNA,作为用作引物的DNA,可列举至少10个碱基以上、优选15个碱基以上的DNA。

[0120] DNA的杂交实验的方法是众所周知的,例如,可以按照分子克隆第4版(Cold Spring Harbor Laboratory Press(2012))、Methods for General and Molecular Bacteriology(ASM Press(1994))、Immunology methods manual(Academic press(1997))以及多种其它的标准教科书来确定杂交的条件并进行实验。

[0121] 另外,按照市售的杂交试剂盒所附带的说明书也可以获得在严谨条件下进行杂交的DNA。作为市售的杂交试剂盒,可列举例如通过随机引物法制作探针并在严谨条件下进行杂交的随机引物DNA标记试剂盒(罗氏诊断公司制)等。

[0122] 上述严谨条件例如可列举如下条件:将固定有DNA的滤膜和探针DNA在含有50%甲酰胺、5×SSC(750mM的氯化钠、75mM的柠檬酸钠)、50mM的磷酸钠(pH7.6)、5×邓哈特溶液、10%的硫酸葡聚糖和20μg/L的变性鲑鱼精子DNA的溶液在42℃下孵育一晚后,例如在约65℃的0.2×SSC溶液中清洗该滤膜。

[0123] 上述各种条件也可以通过添加或变更为了抑制杂交实验的背景而使用的封闭试剂来设定。为了使条件适合,上述封闭试剂的添加可以伴随杂交条件的变更。

[0124] 作为在上述严谨条件下能够杂交的DNA,可列举例如由使用上述BLAST、FASTA等程序进行计算时与序列号5~8和108~110中的任一者所示的碱基序列具有至少60%以上、优选70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上或93%以上、进一步优选95%以上、最优选98%以上的一致性的碱基序列构成的DNA。

[0125] (2) 本发明的醛脱氢酶和编码其的DNA

[0126] 醛脱氢酶(Aldehyde dehydrogenases;ALDH)是生物化学中以NAD(P)⁺为辅酶催化由醛向羧酸的氧化反应的酶组的总称。本说明书中,具有醛脱氢酶活性是指催化使具有醛基的化合物的醛基氧化而转化为羧基的反应的活性。

[0127] 本发明的具有醛脱氢酶活性的蛋白质是具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的活性的蛋白质。即,具有催化由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛向4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反应的活性的蛋白质。本说明书中,这些蛋白质统称为“本发明的醛脱氢酶”或“本发明的ALDH”。

[0128] 一个实施方式的ALDH例如为由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上或60%以上(优选为70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性的氨基酸序列构成并且具有醛脱氢酶活性的

蛋白质。

[0129] 本实施方式的ALDH可以为由序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质。具有序列号19所示的氨基酸序列的蛋白质为大肠杆菌K12 MG1655来源的 γ -氨基丁醛脱氢酶PatD,具有序列号20所示的氨基酸序列的蛋白质为恶臭假单胞菌CSV86来源的苯甲醛脱氢酶XylC,具有序列号21所示的氨基酸序列的蛋白质为恶臭假单胞菌S12来源的苯乙醛脱氢酶StyD,具有序列号22所示的氨基酸序列的蛋白质为恶臭假单胞菌NCIMB 9866来源的4-羟基苯甲醛脱氢酶PchA。由序列号35~46和127~139所示的氨基酸序列构成的蛋白质为表13和表20中记载的微生物来源的、由序列号19、20或21所示的氨基酸序列构成的蛋白质(PatD、XylC或StyD)的同源蛋白(homologous protein)。到目前为止尚不知晓这些蛋白质具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的活性。

[0130] 另一实施方式的ALDH为由上述序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的突变蛋白或同源蛋白,是由与序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上或60%以上的一致性的氨基酸序列构成并且具有醛脱氢酶活性的蛋白质。突变蛋白或同源蛋白的氨基酸序列相对于序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列具有至少50%以上或60%以上、优选70%以上、75%以上、80%以上或85%以上、更优选90%以上、进一步优选93%以上或95%以上、最优选98%以上的一致性。

[0131] 具有醛脱氢酶活性这一点例如可以通过以下方法来确认。首先,通过后述的方法制作含有编码要确认上述活性的蛋白质的DNA的重组体DNA。然后,用该重组体DNA转化大肠杆菌等微生物并培养所得到的微生物,向该培养基中添加4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛和NAD(P)⁺,使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸生成。最后,使用利用HPLC等的常规分析方法检测菌体内、培养上清中的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸,由此可以确认对象蛋白质具有醛脱氢酶活性。

[0132] 又一实施方式的ALDH可以为具有由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性、并且可被归类为以下的1)至6)中的任一者以上的蛋白质。

[0133] 1) 由与序列号19所示的氨基酸序列具有71%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0134] 2) 由与序列号20所示的氨基酸序列具有68%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0135] 3) 假单胞菌(Pseudomonas)属来源的醛脱氢酶,并且由与序列号20所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0136] 4) 由与序列号21所示的氨基酸序列具有63%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0137] 5) 由与序列号40所示的氨基酸序列具有56.5%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0138] 6) 由与序列号41所示的氨基酸序列具有63.9%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0139] 作为这样的具有醛脱氢酶活性的蛋白质,可列举例如由序列号19~21、35~41、44

~ 46、127 ~ 131、133 ~ 135、138和139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质。

[0140] 再一实施方式的ALDH优选为假单胞菌属细菌来源的醛脱氢酶。

[0141] 作为假单胞菌属细菌,可列举例如恶臭假单胞菌、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、假单胞菌属未定种 (*Pseudomonas* sp.)、假单胞菌属未定种MAP12、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、扁桃假单胞菌 (*Pseudomonas amygdali*)、栖稻假单胞菌 (*Pseudomonas oryzihabitans*)、嗜麦芽假单胞菌 (*Pseudomonas maltophilia*)、平凡假单胞菌 (*Pseudomonas trivialis*)、萨氏假单胞菌 (*Pseudomonas savastanoi*)、施氏假单胞菌 (*Pseudomonas stutzeri*)等。

[0142] 另一实施方式的ALDH为苯甲醛脱氢酶,是具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性的蛋白质。

[0143] 本实施方式的苯甲醛脱氢酶具有使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性。苯甲醛脱氢酶是醛脱氢酶的1种,特别是催化由苯甲醛向苯甲酸的氧化反应的酶组的总称。

[0144] 本实施方式的苯甲醛脱氢酶除了上述假单胞菌属细菌来源的苯甲醛脱氢酶以外,还可以为表达苯甲醛脱氢酶的微生物来源的苯甲醛脱氢酶,作为表达苯甲醛脱氢酶的微生物,可列举*Hydrogenophaga aromaticivorans*、交替单胞菌 (*Alteromonas*)、*Tepidiphilus succinatimandens*、渴望盐单胞菌 (*Halomonas cupida*)、*Glaciimonas immobilis*、*Paraburkholderia unamae*、油田水海杆菌 (*Marinobacter salsuginis*)、*Aromatoleum toluclasticum*、伯克霍尔德菌属未定种 (*Burkholderia* sp.)、伯克霍尔德菌属未定种_D7、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、桂林不动杆菌 (*Acinetobacter guillouiae*)、极地单胞菌属未定种 (*Polaromonas* sp.)、芽孢杆菌属未定种 (*Bacillus* sp.)、绿弯菌门细菌 (*Chloroflexi bacterium*)、*Halioxenophilus aromaticivorans*、嗜芳烃新鞘氨醇菌 (*Novosphingobium aromaticivorans*)、伊平屋桥大洋芽孢杆菌 (*Oceanobacillus iheyensis*)、*Sphingobium chungbukense*、紫红链霉菌 (*Streptomyces violaceoruber*)、食醚红球菌 (*Rhodococcus aetherivorans*)、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*)、秃裸链霉菌 (*Streptomyces calvus*)、*Prauserella muralis*、乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、野油菜黄单胞菌 (*Xanthomonas campestris*)、食酸菌属未定种 (*Acidovorax* sp.)、链霉菌属未定种 (*Streptomyces* sp.)等。

[0145] 一个实施方式的苯甲醛脱氢酶可以为由序列号20、40、41、43、127 ~ 137和139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质。另外,另一实施方式的苯甲醛脱氢酶可以为由上述序列号20、40、41、43、127 ~ 137和139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的突变蛋白或同源蛋白,是由与序列号20、40、41、43、127 ~ 137和139中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上或60%以上(优选为65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性的氨基酸序列构成并且具有醛脱氢酶活性的蛋白质。

[0146] 又一实施方式的苯甲醛脱氢酶可以为具有由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性、并且可被归类为以下的7)至12)中的任一者以上的蛋白质。

[0147] 7) 由与序列号19所示的氨基酸序列具有71%以上的一致性的氨基酸序列构成的

蛋白质

[0148] 8) 由与序列号20所示的氨基酸序列具有68%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0149] 9) 假单胞菌属来源的醛脱氢酶,并且由与序列号20所示的氨基酸序列具有50%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0150] 10) 由与序列号21所示的氨基酸序列具有63%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0151] 11) 由与序列号40所示的氨基酸序列具有56.5%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0152] 12) 由与序列号41所示的氨基酸序列具有63.9%以上的一致性的氨基酸序列构成的蛋白质

[0153] 作为这样的苯甲醛脱氢酶,可列举例如由序列号20、40、41、127~131、133~135和139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质。

[0154] 再一实施方式的ALDH可以为具有由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的醛脱氢酶活性、并且由与序列号20所示的氨基酸序列具有50%以上(优选为55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性且在与序列号20所示的氨基酸序列比对时含有下述(1)~(26)中的至少一个氨基酸基的氨基酸序列构成的蛋白质。

[0155] (1) 与第35位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0156] (2) 与第65位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0157] (3) 与第82位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基(L)

[0158] (4) 与第104位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0159] (5) 与第109位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0160] (6) 与第110位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基(I)

[0161] (7) 与第117位对应的位置的氨基酸残基为谷氨酰胺残基(Q)

[0162] (8) 与第122位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0163] (9) 与第124位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基(L)

[0164] (10) 与第134位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基(V)

[0165] (11) 与第144位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基(V)

[0166] (12) 与第160位对应的位置的氨基酸残基为苯丙氨酸残基(F)

[0167] (13) 与第271位对应的位置的氨基酸残基为甘氨酸残基(G)

[0168] (14) 与第290位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0169] (15) 与第319位对应的位置的氨基酸残基为天冬氨酸残基(D)

[0170] (16) 与第333位对应的位置的氨基酸残基为天冬氨酸残基(D)

[0171] (17) 与第365位对应的位置的氨基酸残基为谷氨酰胺残基(Q)

[0172] (18) 与第390位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基(I)

[0173] (19) 与第420位对应的位置的氨基酸残基为丙氨酸残基(A)

[0174] (20) 与第423位对应的位置的氨基酸残基为亮氨酸残基(L)

[0175] (21) 与第434位对应的位置的氨基酸残基为缬氨酸残基(V)

[0176] (22) 与第440位对应的位置的氨基酸残基为脯氨酸残基(P)

[0177] (23) 与第443位对应的位置的氨基酸残基为半胱氨酸残基(C)

[0178] (24) 与第445位对应的位置的氨基酸残基为脯氨酸残基(P)

[0179] (25) 与第466位对应的位置的氨基酸残基为丝氨酸残基(S)

[0180] (26) 与第467位对应的位置的氨基酸残基为异亮氨酸残基(I)

[0181] 在此,例如“与第35位对应的位置的氨基酸残基”是指:将对象蛋白质的氨基酸序列与序列号20所示的氨基酸序列进行比对时,对象蛋白质的氨基酸序列中的处于与序列号20的第35位的氨基酸残基的位置对应的位置的氨基酸残基。

[0182] 如后述实施例所示,启示了上述(1)~(26)所示的氨基酸残基是在对反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的特异性特别高的ALDH中保守的氨基酸残基。因此认为,本实施方式的醛脱氢酶的氨基酸序列由于含有上述(1)~(26)中的至少一个氨基酸基而对反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛具有特异性。即,本实施方式的ALDH可具有反式选择性(也称为反式特异性)高的醛脱氢酶活性。在此,反式选择性高是指,使用ALDH制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸时,生成的含有氨甲环酸(TXA)和/或顺式-TXA的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸中使用后述的数学式2所示的计算式计算出的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式比率超过50%,反式特异性特别高是指上述反式比率为70%以上。需要说明的是,本申请中的“选择性”可视为与“特异性”含义相同,另外,“选择”可视为与“特异”含义相同。

[0183] 本实施方式的醛脱氢酶的氨基酸序列含有上述(1)~(26)中的至少一个氨基酸基即可,例如,可以含有2个以上、3个以上、4个以上、5个以上、6个以上、7个以上、8个以上、9个以上、10个以上、11个以上、12个以上、13个以上、14个以上、15个以上、16个以上、17个以上、18个以上、19个以上、20个以上、21个以上、22个以上、23个以上、24个以上、25个以上或全部26个。

[0184] 氨基酸序列的比对例如可以使用公知的比对程序Clustal Omega来创建。Clustal Omega例如可以从<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>来利用。使用Clustal Omega创建比对时的参数例如可以使用默认值。

[0185] 本实施方式的醛脱氢酶可以由与序列号20、40、41、127、128、130、131和133中的任一者所示的氨基酸序列具有50%以上(优选为55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上或98%以上)的一致性的氨基酸序列构成并且具有醛脱氢酶活性的蛋白质。

[0186] 本实施方式的编码醛脱氢酶(ALDH)的DNA为编码具有上述醛脱氢酶活性的蛋白质的DNA。一个实施方式的编码ALDH的DNA为编码由序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的碱基序列,作为其一例,可列举由序列号23~26、47~58和140~152中的任一者所示的碱基序列构成的DNA。

[0187] 另一实施方式的编码ALDH的DNA为编码由序列号19~22、35~46和127~139中的任一者所示的氨基酸序列构成的蛋白质的突变蛋白或同源蛋白的DNA。编码突变蛋白或同源蛋白的DNA可以在序列号23~26、47~58和140~152中的任一者所示的碱基序列的任意位置处缺失、置换、插入或添加1~50个碱基,例如可以缺失、置换、插入或添加1~40个、1~30个、1~25个、1~20个、1~15个、1~10个、1~5个、1~4个、1~3个、1~2个或1个碱基。一个实施方式的编码ALDH的DNA优选由与序列号23~26、47~58和140~152中的任一者所示

的碱基序列具有至少50%以上或60%以上、优选70%以上、75%以上、80%以上、85%以上或90%以上、进一步优选93%以上或95%以上、最优选98%以上的一致性的碱基序列构成,更优选由序列号23~26、47~58和140~152中的任一者所示的碱基序列构成。

[0188] 一个实施方式的编码ALDH的DNA可以为与由序列号23~26、47~58和140~152中的任一者所示的碱基序列的互补碱基序列构成的DNA在严谨条件下杂交的DNA。作为在严谨条件下能够杂交的DNA,可列举例如由使用BLAST、FASTA等程序进行计算时与序列号23~26、47~58和140~152中的任一者所示的碱基序列具有至少50%以上或60%以上、优选70%以上、75%以上、80%以上、85%以上或90%以上、进一步优选93%以上或95%以上、最优选98%以上的一致性的碱基序列构成的DNA。

[0189] 3. 本发明的重组体DNA

[0190] 本发明的重组体DNA含有编码本发明的氨基转移酶的DNA和/或编码本发明的醛脱氢酶的DNA。可以还含有后述的编码丙氨酸脱氢酶的DNA和/或编码NADH氧化酶的DNA。本发明的重组体DNA可以在一个重组体DNA中含有仅编码一种酶的DNA,也可以在一个重组体DNA中含有编码两种以上酶的DNA。两种以上的情况下,各个酶可以由一个启动子控制,也可以由各自的启动子控制。

[0191] 本发明的重组体DNA为能够在宿主细胞中自主复制的载体和/或能够整合到宿主细胞的染色体中的载体,是能够转录上述DNA的载体。

[0192] 使用细菌等原核生物作为宿主细胞的情况下,本发明的重组体DNA优选除了含有编码上述各种酶的DNA以外还含有启动子、核糖体结合序列和转录终止序列,进而可以含有控制启动子的基因。在此,优选将作为核糖体结合序列的SD(Shine-Dalgarno)序列与起始密码子之间调节为合适距离、例如6~18个碱基。本发明的重组体DNA中,对于编码上述各种酶的DNA的表达而言不一定需要转录终止序列,但是优选在紧邻结构基因的下游配置转录终止序列。

[0193] 作为载体,只要是用于将目标DNA导入宿主并进行增殖、表达的合适的DNA分子则没有特别限定,不仅可以是质粒,还可以使用例如人工染色体、使用转座子的载体、柯斯质粒。

[0194] 使用属于埃希氏菌属的微生物作为导入本发明的重组体DNA的宿主细胞时,作为载体,可列举例如pColIdI、pSTV28、pSTV29、pUC118(均为宝生物公司制)、pMW118、pMW119、pMW218(均为NIPPON GENE公司制)、pET21a、pET28a、pCDF-1b、pRSF-1b(均为默克密理博公司制)、pMAL-c5x(ニユーイングランドバイオラブス公司制)、pGEX-4T-1、pTrc99A(均为GE医疗生命科学公司制)、pTrcHis、pSE280(均为赛默飞世尔科技公司制)、pGEMEX-1(普洛麦格公司制)、pQE-30、pQE-60、pQE80L(均为QIAGEN公司制)、pET-3、pBluescriptII SK(+)、pBluescriptII KS(-)(均为安捷伦科技公司制)、pKYP10(日本特开昭58-110600号公报)、pKYP200[Agric.Biol.Chem., 48, 669(1984)]、pLSA1[Agric.Biol.Chem., 53, 277(1989)]、pGEL1[Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 82, 4306(1985)]、pTrs30[由大肠杆菌JM109/pTrs30(FERM BP-5407)制备]、pTrs32[由大肠杆菌JM109/pTrs32(FERM BP-5408)制备]、pTK31[APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, 2007, Vol.73, No.20, p6378-6385]、pPE167[Appl.Environ.Microbiol.2007, 73:6378-6385]、pPAC31(W098/12343)、pUC19[Gene, 33, 103(1985)]、pPA1(日本特开昭63-233798号公报)等。

[0195] 作为使用上述载体时的启动子,只要是在属于埃希氏菌属的微生物的细胞中发挥功能的启动子则任一者均可,可以使用例如trp启动子、gapA启动子、lac启动子、PL启动子、PR启动子、PSE启动子等来源于大肠杆菌、噬菌体等的启动子。另外,也可以使用将2个trp启动子串联而成的启动子、tac启动子、trc启动子、lacT5启动子、lacT7启动子、let I启动子之类的经人为设计改造的启动子。

[0196] 使用棒杆菌型细菌作为导入本发明的重组体DNA的宿主细胞时,作为载体,可列举例如pCG1(日本特开昭57-134500号公报)、pCG2(日本特开昭58-35197号公报)、pCG4(日本特开昭57-183799号公报)、pCG11(日本特开昭57-134500号公报)、pCG116、pCE54、pCB101(均参见日本特开昭58-105999号公报)、pCE51、pCE52、pCE53[均参见Molecular and General Genetics,196,175(1984)]等。

[0197] 作为使用上述载体时的启动子,只要是在棒杆菌型细菌的细胞中发挥功能的启动子则任一者均可,可以使用例如P54-6启动子[Appl.Microbiol.Biotechnol.,53,p674-679(2000)]。

[0198] 使用酵母菌株作为导入本发明的重组体DNA的宿主细胞时,作为载体,可列举例如YEp13(ATCC37115)、YEp24(ATCC37051)、YCp50(ATCC37419)、pHS19、pHS15等。

[0199] 作为使用上述载体时的启动子,只要是在酵母菌株的细胞中发挥功能的启动子则任一者均可,可列举例如PH05启动子、PGK启动子、GAP启动子、ADH启动子、gal1启动子、gal10启动子、热休克多肽启动子、MF α 1启动子、CUP1启动子等启动子。

[0200] 本发明的重组体DNA例如可以通过使用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)、或者对编码期望的酶的DNA片段进行限制酶处理等并插入到上述的合适的表达载体的启动子的下游来制作。

[0201] 4.本发明的重组细胞

[0202] 本发明的重组细胞为含有本发明的DNA的重组细胞、或者通过用本发明的重组体DNA转化宿主细胞而得到的重组细胞。另外,可以还含有后述的编码丙氨酸脱氢酶的DNA和/或编码NADH氧化酶的DNA。重组细胞中,本发明的DNA或重组体DNA可以被整合到基因组中,也可以以能够自主复制的质粒形式存在,以能够转录的状态包含本发明的DNA。一个宿主细胞可以仅含有1种DNA,也可以含有2种以上DNA。

[0203] 宿主细胞可以为原核生物、酵母、动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等中的任一种,可优选列举原核生物或酵母菌株,可更优选列举属于埃希氏菌属、沙雷氏菌属、芽孢杆菌属、短杆菌属、棒杆菌属、微杆菌属或假单胞菌属等的原核生物、或者属于酵母属、裂殖酵母属、克鲁维酵母属、丝孢酵母属、许旺酵母属、毕赤酵母属或假丝酵母属等的酵母菌株,可最优选列举大肠杆菌BL21 codon plus、大肠杆菌XL1-Blue、大肠杆菌XL2-Blue(均为安捷伦科技公司制)、大肠杆菌BL21(DE3)(ノバジェン公司制)、大肠杆菌BL21(DE3)pLysS(默克密理博公司制)、大肠杆菌DH5 α 、大肠杆菌HST08Premium、大肠杆菌HST02、大肠杆菌HST04 dam-/dcm-、大肠杆菌JM109、大肠杆菌HB101、大肠杆菌CJ236、大肠杆菌BMH71-18 mutS、大肠杆菌MV1184、大肠杆菌TH2(均为宝生物公司制)、大肠杆菌W、大肠杆菌JM101、大肠杆菌W3110、大肠杆菌MG1655、大肠杆菌DH1、大肠杆菌MC1000、大肠杆菌W1485、大肠杆菌MP347、大肠杆菌NM522、大肠杆菌ATCC9637、无花果沙雷氏菌(*Serratia ficaria*)、居泉沙雷氏菌(*Serratia fonticola*)、液化沙雷氏菌(*Serratia liquefaciens*)、粘质沙雷氏菌(*Serratia*

marcescens)、枯草芽孢杆菌、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、*Brevibacterium immariophilum* ATCC14068、解糖短杆菌 (*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC14066、产氨棒杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC13032、谷氨酸棒杆菌 ATCC14067、谷氨酸棒杆菌 ATCC13869、嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870、嗜氨微杆菌 (*Microbacterium ammoniophilum*) ATCC15354或假单胞菌属未定种D-0110等原核生物、或者酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、茁芽丝孢酵母 (*Trichosporon pullulans*)、河岸许旺酵母 (*Schwanniomyces alluvius*)、巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 或产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 等酵母菌株。

[0204] 作为以能够在宿主细胞中自主复制的质粒形式导入本发明的重组体DNA的方法,可列举例如使用钙离子的方法[Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,69,2110(1972)]、原生质体法(日本特开昭63-248394号公报)、电穿孔法[Nucleic Acids Res.,16,6127(1988)]以及原生质球法[Proc.Natl.Acad.Sci.,USA,81,4889(1984)]、乙酸锂法[J.Bacteriol.,153,163(1983)]等方法。

[0205] 作为将本发明的重组体DNA导入宿主细胞的染色体中的方法,可列举例如同源重组法。作为同源重组法,可列举例如使用同源重组用质粒的方法,所述同源重组用质粒可以通过与不能在想要导入的宿主细胞内自主复制的具有抗药基因的质粒DNA连接而制作。作为经常用于大肠杆菌的利用同源重组的方法,可列举例如使用 λ 噬菌体的同源重组系统导入重组体DNA的方法[Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97,6641-6645(2000)]。

[0206] 进而,使用利用了通过与重组体DNA一起整合到染色体上的枯草杆菌果聚糖蔗糖酶而使大肠杆菌变成蔗糖敏感性这一点的选择法、利用了通过在具有链霉素抗性的突变rpsL基因的大肠杆菌中整合野生型rpsL基因而使大肠杆菌变成链霉素敏感性这一点的选择法[Mol.Microbiol.,55,137(2005)、Biosci.Biotechnol.Biochem.,71,2905(2007)]等,可以获得宿主细胞的染色体DNA上的目标区域被替换为本发明的DNA或重组体DNA的大肠杆菌。

[0207] 5. 本发明的制造方法

[0208] 本发明的制造方法为用于由1,4-双(氨甲基)环己烷制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法,其包括:

[0209] (i) 在氨基转移酶存在下由1,4-双(氨甲基)环己烷制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的步骤;以及

[0210] (ii) 在醛脱氢酶存在下由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的步骤。

[0211] 本实施方式的制造方法包括在方法的一部分或全部中使丙氨酸脱氢酶和/或NADH氧化酶共存的步骤。特别是,优选在第1步(步骤(i))中使丙氨酸脱氢酶和/或NADH氧化酶共存、在第2步(步骤(ii))中使NADH氧化酶共存。

[0212] 本发明的制造方法的各步骤的底物物质(第1步中使用的1,4-双(氨甲基)环己烷或第2步中使用的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛)与各步骤中作为目标的生成物(第1步中的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛或第2步中的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸)的立体结构不同的情况

下,优选本实施方式的制造方法的一部分或全部在中性或碱性条件下进行,例如,优选第1步的步骤的一部分或全部以及/或者第2步的步骤的一部分或全部在中性或碱性条件下进行。使反应在中性或碱性条件下进行时,可促进作为反应中间体的4-(氨基)环己烷-1-甲醛的顺式体异构化为反式体或者反式体异构化为顺式体。在pH9以上的碱性条件下特别容易异构化,4-(氨基)环己烷-1-甲醛的异构化在反式比率约60%时达到平衡。由此,例如以氨基环酸为最终目标产物时,即使在使用顺式体或者顺式体和反式体的混合物作为底物的情况下,通过使用后述的反式选择性高的醛脱氢酶,也可以更多地得到反式体的4-(氨基)环己烷-1-甲酸,即,可以得到产物混合物的更高的反式比率。由此,能够以高收率制造氨基环酸。另一方面,在以反式体作为底物的情况下,通过设为酸性(例如pH4~6),可以通过防止异构化来更多地得到反式体产物。

[0213] 中性是指反应液的pH为7左右,碱性是指反应液的pH大于7且为12以下,中性或碱性是指反应液的pH优选为7~12,更优选为7~10。作为设为碱性的方法,没有特别限定,可通过添加碱溶液、尿素、碳酸钙、氨等来实现。步骤的一部分在中性或碱性下进行是指从该步骤开始至中途设为中性或碱性、或者从中途至结束设为中性或碱性。在此,步骤开始是指使反应液含有酶之前,步骤结束是指酶反应结束后(以下同样)。通过中性或碱性而使顺式体异构化为反式体时,可以得到20%以上、例如40%以上或50%以上、60%以上的异构化率。另外,使反式体异构化为顺式体时,可以得到20%以上、例如30%以上或35%以上的异构化率。

[0214] 本发明的制造方法的各步骤的底物物质与作为目标的生成物的立体结构不同时,优选使反应步骤的一部分或全部在仲胺存在下进行。通过存在仲胺,可促进4-(氨基)环己烷-1-甲醛的异构化。作为仲胺,可列举例如L-脯氨酸、吡咯烷、吡咯烷衍生物、反式-4-羟基-L-脯氨酸等。作为反应液中仲胺的添加量,可以为0.01~500mM,优选为0.1~200mM。通过添加仲胺,可以得到20%以上、例如60%以上的顺式体向反式体的异构化率,或者,可以得到20%以上、例如30%以上或35%以上的反式体向顺式体的异构化率。

[0215] (1) 制造4-(氨基)环己烷-1-甲醛的步骤

[0216] 本发明的制造方法包括(i)在氨基转移酶存在下由1,4-双(氨基)环己烷制造4-(氨基)环己烷-1-甲醛的步骤(以下也称为第1步)。作为氨基转移酶,优选为本发明的氨基转移酶。在氨基转移酶存在下是指(i)的反应体系中存在能够催化(i)的反应的方式具有活性的氨基转移酶。例如包括下述步骤:向反应体系中添加本发明的氨基转移酶;或者,使含有编码本发明的氨基转移酶的DNA且能够表达该氨基转移酶的细胞、或者通过用含有编码本发明的氨基转移酶的DNA的重组体DNA转化宿主细胞而得到的能够表达该氨基转移酶的细胞进行作用。在此,使细胞进行作用是指向培养细胞的体系中添加底物物质而与细胞所表达的蛋白质进行作用。

[0217] 第1步可以使用具有氨基转移活性的蛋白质作为酶源并使该酶源和反应底物存在于水性介质中而使4-(氨基)环己烷-1-甲醛在水性介质中生成、蓄积,也可以在培养基中培养具有生产氨基转移酶的能力的细胞而使4-(氨基)环己烷-1-甲醛在该培养物中生成、蓄积。

[0218] 使用酶源的方法中,作为酶源,可以为纯化后的蛋白质,或者,也可以为在培养基中培养具有生产有目标活性的蛋白质的能力的细胞而得到的培养物或该培养物的处理物。

[0219] 上述培养物或培养物的处理物含有作为酶源的有目标活性的蛋白质。作为培养物的处理物,可列举培养物的浓缩物、培养物的干燥物、培养物经离心分离而得到的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冷冻干燥物、该菌体的表面活性剂处理物、该菌体的超声波处理物、该菌体的机械磨碎处理物、该菌体的溶剂处理物、该菌体的酶处理物、该菌体的蛋白质分级物、该菌体的固定物或从该菌体提取得到的酶标准品等。

[0220] 在第1步中使用上述酶源的方法中,在使用纯化后的蛋白质作为酶源时,作为具有氨基转移活性的蛋白质的量,相对于1,4-双(氨甲基)环己烷为0.01~100重量%即可,优选为0.1~50重量%。作为酶源,在使用培养物或该培养物的处理物作为酶源时,该酶源的量根据该酶源的比活性等不同,例如相对于1,4-双(氨甲基)环己烷以湿菌体重量计为5~1000重量%即可,优选为10~400重量%。

[0221] 作为水性介质,可列举水、磷酸盐、碳酸盐、乙酸盐、硼酸盐、柠檬酸盐、Tris、2-吗啉代乙磺酸(以下记作MES)、3-吗啉代丙磺酸(以下记作MOPS)、N-环己基-2-氨基乙磺酸(以下记作CHES)等缓冲液、甲醇、乙醇等醇类、乙酸乙酯等酯类、丙酮等酮类、乙酰胺等酰胺类等。另外,也可以使用作为酶源使用的微生物的培养液作为水性介质。

[0222] 如上述1.中所述,由1,4-双(氨甲基)环己烷产生4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的反应为在能够提供羰基的化合物存在下使氨基转移酶(具有氨基转移活性的蛋白质)进行催化的酶反应。因此,优选在第1步中使能够提供羰基的化合物共存。

[0223] 作为能够提供羰基的化合物,可列举酮酸,可优选列举丙酮酸、 α -酮戊二酸、 α -酮丁酸等。

[0224] 酮酸只要可成为本发明的氨基转移酶的底物则其来源不限,可以直接使用具有生产酮酸的能力的微生物的培养物或该培养物的处理物,或者可以使用从该培养物或该培养物的处理物中回收的酮酸。

[0225] 另外,在培养基中培养微生物而使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成、蓄积时,可以使用具有生产酮酸的能力的微生物作为该微生物。具有生产酮酸的能力的微生物可列举例如使在生物体内参与丙酮酸分解的丙酮酸脱氢酶复合物的基因发生了缺失或弱化的微生物、使乳酸脱氢酶基因发生了缺失或弱化的微生物、使丙酮酸氧化酶基因发生了缺失或弱化的微生物等。在此,“弱化”是指对象基因(这里为丙酮酸脱氢酶复合物的基因)的表达量降低。

[0226] 在第1步中添加酮酸时,作为添加量,相对于1,4-双(氨甲基)环己烷以摩尔比计为0.01~100即可,优选为0.01~60。

[0227] 在第1步的反应步骤中,在使用丙酮酸作为酮酸的情况下,优选使丙氨酸脱氢酶(alanine dehydrogenase;AlaDH)共存。如上述1.中所说明的那样,AlaDH为能够利用 NAD^+ 作为辅酶催化产生的丙氨酸转化(再生)为丙酮酸的酶。因此,通过使AlaDH共存,丙酮酸能够被再利用,能够以少的原料高效地制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛。另外,在使AlaDH共存的情况下,优选在反应中添加所需的 NAD^+ 。

[0228] AlaDH为丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢酶之一,是催化(丙氨酸+水+ NAD^+)与(丙酮酸+ NH_3 + $\text{NADH}+\text{H}^+$)之间的可逆反应的氧化还原酶。在本发明的氨甲环酸的制造方法的第1步中,在使用丙酮酸作为酮酸的情况下,可以将产生的丙氨酸转化为丙酮酸。

[0229] 作为AlaDH,没有特别限定,可以为例如枯草芽孢杆菌、假硬碱性卤杆菌

(*Alkalihalobacillus pseudofirmus*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)来源的AlaDH,具体而言,可列举枯草芽孢杆菌168来源的丙氨酸脱氢酶BsAlaDH(登录号:WP_003243280.1)、假硬碱性卤杆菌来源的丙氨酸脱氢酶ApAlaDH(登录号:WP_012957376.1)、金黄色葡萄球菌来源的丙氨酸脱氢酶SaAlaDH(登录号:WP_000689998.1)。

[0230] 关于使AlaDH共存,可以在第1步的酶反应中添加表达AlaDH的细胞的培养物或该培养物的处理物,也可以共培养表达AlaDH的细胞,还可以使上述重组细胞含有编码AlaDH的DNA。

[0231] 作为AlaDH的量,相对于氨基转移反应中产生的丙氨酸为0.01~100重量%即可,优选为0.1~50重量%。在使用培养物或该培养物的处理物作为酶源时,该酶源的量根据该酶源的比活性等而不同,例如,相对于1,4-双(氨甲基)环己烷以湿菌体重量计为5~1000重量%即可,优选为10~400重量%。另外,优选添加NAD⁺。关于NAD⁺的添加量,相对于氨基转移反应中产生的丙氨酸以摩尔比计为0.01~100即可,优选为0.01~60。

[0232] 作为底物物质的1,4-双(氨甲基)环己烷可以为反式体、顺式体或它们的混合物中的任一者,从原料获取容易性出发,优选为反式体与顺式体的混合物。另外,作为目标的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛可以为反式体、顺式体或它们的混合物中的任一者。生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛被供于氨甲环酸的制造时,优选为反式体。在反式体和顺式体的混合物中,反式体与顺式体的比率没有限定,但优选反式体的比率超过50%。

[0233] (2) 制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的步骤

[0234] 本发明的制造方法包括(ii)在醛脱氢酶存在下由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的步骤(以下也称为第2步)。优选包括使本发明的具有醛脱氢酶活性的蛋白质、含有编码本发明的具有醛脱氢酶活性的蛋白质的DNA的细胞、或者通过用含有编码本发明的具有醛脱氢酶活性的蛋白质的DNA的重组体DNA转化宿主细胞而得到的重组细胞作用于4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的步骤。

[0235] 第2步可以使用具有醛脱氢酶活性的蛋白质作为酶源并使该酶源和反应底物存在于水性介质中而使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸在水性介质中生成、蓄积,也可以在培养基中培养具有生产醛脱氢酶的能力的微生物而使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸在培养物中生成、蓄积。

[0236] 如上述1.中所述,由4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反应是在作为辅酶的NAD(P)⁺存在下使醛脱氢酶(具有醛脱氢酶活性的蛋白质)进行催化的酶反应。醛脱氢酶包括偏好以NAD⁺为辅酶的NAD⁺型、偏好以NADP⁺为辅酶的NADP⁺型、能够利用NAD⁺和NADP⁺这两者为辅酶的类型。因此,优选使所使用的醛脱氢酶的利用性高的辅酶共存。

[0237] 作为NAD(P)⁺的量,相对于4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛以摩尔比计为0.01~100即可,优选为0.01~60。

[0238] 另外,作为供给辅酶的方法,可以使用具有生产辅酶的能力的微生物作为表达醛脱氢酶的宿主。由此,可预期4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸生产量的进一步提高。具有生产辅酶的能力的微生物可列举例如使在生物体内参与NAD(P)⁺分解的基因发生了缺失或弱化的微生物、增强或导入了参与NAD(P)⁺生成的基因(例如pncB、nadA、nadB)的微生物、使抑制上述参与NAD(P)⁺生成的基因产物的表达或功能的基因(例如nadR)发生了缺损或弱化的微生

物、或者使参与NAD(P)⁺分解的基因(例如mazG、nudC)发生了缺损或弱化的微生物等。

[0239] 作为醛脱氢酶的量,相对于1,4-双(氨基)环己烷为0.01~100重量%即可,优选为0.1~50重量%。使用培养物或该培养物的处理物作为酶源时,该酶源的量根据该酶源的比活性等不同,例如相对于4-(氨基)环己烷-1-甲醛以湿菌体重量计为5~1000重量%即可,优选为10~400重量%。

[0240] 优选在第2步的步骤中使NAD(P)H氧化酶(NAD(P)H Oxidase;NOX)共存。

[0241] NAD(P)H氧化酶为代谢酶之一,是催化将(NAD(P)H+H⁺+O₂)转化为(NAD(P)⁺+H₂O₂或H₂O)的反应的氧化还原酶。可以将本发明的4-(氨基)环己烷-1-甲醛的制造方法的第1步和第2步中产生的NAD(P)H转化为NAD(P)⁺。因此,通过使NAD(P)H氧化酶共存,NAD(P)⁺能够被再利用,能够以少的原料高效地制造4-(氨基)环己烷-1-甲酸。

[0242] 作为NOX,没有特别限定,可以为例如枯草芽孢杆菌、变形链球菌(*Streptococcus mutans*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)来源的NOX,具体而言,可列举枯草芽孢杆菌168来源的NADH氧化酶BsNOX(登录号:NP_389836.1)、变形链球菌来源的NADH氧化酶SmNOX(登录号:WP_002268044.1)、乳酸乳球菌来源的NADH氧化酶L1NOX(登录号:CAL97012.1)、粪肠球菌来源的NADH氧化酶EfNOX(登录号:WP_002361833.1)。

[0243] 关于使NAD(P)H氧化酶共存,可以添加表达NAD(P)H氧化酶的细胞的培养物或该培养物的处理物,或者,也可以共培养表达NAD(P)H氧化酶的细胞,或者,还可以使上述重组细胞含有编码NAD(P)H氧化酶的DNA。

[0244] 作为NAD(P)H氧化酶的量,相对于在第1步中使用丙氨酸脱氢酶的情况下生成的NAD(P)H和在第2步中由ALDH生成的NAD(P)H的合计量为0.001~100重量%即可,优选为0.01~50重量%。使用培养物或该培养物的处理物作为酶源时,该酶源的量根据该酶源的比活性等不同,例如相对于1,4-双(氨基)环己烷以湿菌体重量计为0.5~1000重量%即可,优选为1~400重量%。

[0245] 也可以代替使NAD(P)H氧化酶共存,而通过将NAD(P)H电化学氧化使NAD(P)⁺再生。

[0246] 作为底物物质的4-(氨基)环己烷-1-甲醛可以为反式体、顺式体或它们的混合物中的任一者。在底物与目标化合物的立体结构不同的情况下,优选方法的一部分或全部在中性或碱性下进行,进而优选方法的一部分或全部在仲胺存在下进行。在底物与目标化合物的立体结构相同的情况下,优选方法的一部分或全部在酸性下进行。

[0247] 上述作为目标的4-(氨基)环己烷-1-甲酸可以为顺式体、反式体或它们的混合物中的任一者。在以顺式体(即,顺式-氨基环酸)为目标的情况下,作为第2步的具有醛脱氢酶活性的蛋白质,优选使用能够接受一个实施方式的顺式体底物的酶、序列号19、21、22、35~37、39、44~46、132、134、135和138中的任一者、或者它们的突变蛋白或同源蛋白。在以反式体(即,氨基环酸)为目标的情况下,作为第2步的具有醛脱氢酶活性的蛋白质,优选使用一个实施方式的反式选择性高的酶、序列号20、38、40、41、127、128、129、130、131、133和139中的任一者、或者它们的突变蛋白或同源蛋白。其中,更优选使用反式特异性特别高的酶、序列号20、40、41、127、128、130、131和133中的任一者、或者它们的突变蛋白或同源蛋白。在以顺式体和反式体的混合物为目标的情况下,可以使用本发明的任意的醛脱氢酶。顺式体和反式体的混合物的反式体比率优选为30%以上、例如40%以上、50%以上、60%以上或

70%以上。

[0248] 本说明书中,反式选择性高的酶(ALDH)是指后述的实施例中计算出的通过使用1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物进行的两阶段反应而生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸(AMCHA)的反式体比率超过50%(例如51%以上、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上)的酶,其中,将反式体比率为70%以上的酶作为反式选择性特别高的酶。更具体而言,AMCHA的反式比率例如可以通过将AMCHA的反式体生成量相对于AMCHA的反式体生成量和AMCHA的顺式体生成量的合计量的比率乘以100来计算。这些反式特异性高的酶(ALDH)可以以高收率制造氨甲环酸,因此可以说在氨甲环酸的制造中是有益的。

[0249] 第1步和第2步可以分开进行,也可以在同一体系中同时推进来进行。这种情况下,各种酶可以包含在细胞中,也可以为纯化后的蛋白质,另外还可以一部分包含在细胞中、一部分为纯化后的蛋白质。

[0250] 上述细胞的培养可以按照常规方法来实施。作为培养该细胞的培养基,只要是含有该细胞可同化的碳源、氮源和无机盐类等且能够高效地进行该细胞的培养的培养基,则天然培养基、合成培养基均可使用。

[0251] 在利用发酵法的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法中,优选向培养基中添加作为底物的1,4-双(氨甲基)环己烷。1,4-双(氨甲基)环己烷可以添加到培养前的培养基中,也可以在培养中途添加到培养液中。

[0252] 另外,也可以代替向培养基中添加1,4-双(氨甲基)环己烷,而通过将具有生成1,4-双(氨甲基)环己烷的能力的微生物与上述细胞进行共培养来供给1,4-双(氨甲基)环己烷。

[0253] 作为碳源,只要为该细胞可同化的碳源即可,可列举例如葡萄糖、果糖、蔗糖、含有这些的糖蜜、甘油、淀粉和淀粉水解产物等碳水化合物、乙酸和丙酸等有机酸以及乙醇和丙醇等醇类等。

[0254] 作为氮源,可列举例如氨、氯化铵、硫酸铵、乙酸铵和磷酸铵等无机酸或有机酸的铵盐、其它含氮化合物、以及蛋白胨、肉提取物、酵母提取物、玉米浆、酪蛋白水解产物、大豆粕和大豆粕水解产物、各种发酵菌体及其消化物等。

[0255] 作为无机盐,可列举例如磷酸二氢钾、磷酸二氢钾、磷酸镁、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸铜和碳酸钙等。

[0256] 在利用发酵法的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的制造方法中,可以向培养基中添加成为氨基转移酶或醛脱氢酶的底物的丙酮酸、 α -酮戊二酸、 α -酮丁酸、 NAD^+ 、 NADP^+ 等。另外,为了诱导4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的异构化,可以向培养基中添加仲胺、优选L-脯氨酸、吡咯烷衍生物等。

[0257] 另外,也可以代替添加上述化合物,而通过将具有生产这些化合物的能力的微生物与上述细胞进行共培养、与上述酶共表达来供给这些化合物。

[0258] 培养通常优选在振荡培养或深部通气搅拌培养等需氧条件下进行。培养温度优选为15~40℃,培养时间通常为5小时~7天。培养中的pH优选保持在3.0~9.0。pH的调节使用无机或有机的酸、碱溶液、尿素、碳酸钙、氨等进行。

[0259] 另外,在培养中,可以根据需要向培养基中添加氨苄青霉素、卡那霉素等抗生素。在培养利用使用诱导性启动子作为启动子的表达载体转化而成的重组细胞时,可以根据需

要向培养基中添加诱导剂。

[0260] 例如,在培养利用使用lac启动子的表达载体转化而成的微生物时,可以向培养基中添加异丙基- β -D-硫代半乳糖苷等,在培养利用使用trp启动子的表达载体转化而成的微生物时,可以向培养基中添加吡啶丙烯酸等。

[0261] 通过上述培养,使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸在培养物中或菌体内生成,由此,可以制造4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸、优选氨甲环酸。4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的定量可以使用LCMS(例如岛津制作所公司制造的分析装置LCMS-8040)来实施。

[0262] 从该培养物中收集4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸通常可以通过组合离子交换树脂法、沉淀法、其它公知方法来实施。需要说明的是,在4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸在菌体内蓄积的情况下,例如可以通过离子交换树脂法等从将菌体利用超声波等进行破碎、利用离心分离除去菌体而得到的上清中收集4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

[0263] [分析例]1,4-双(氨甲基)环己烷、4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛或4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的分析、定量

[0264] 在实施例1中,1,4-双(氨甲基)环己烷、4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛或4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的分析、定量通过以下所示的步骤来进行。

[0265] 对含有酶反应后的酶的反应液、含有静态菌体反应后的微生物的反应液或含有培养后的微生物的培养液进行离心分离,回收上清。利用LCMS-8040(岛津制作所制)对该上清中所含的1,4-双(氨甲基)环己烷、4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛或4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸进行分析。可以通过下述分析条件来分离4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛和4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸中的顺式-反式异构体。

[0266] [分析条件]

[0267] 柱:Develosil(商标)ODS-HG 5 μ m 2.0 $\times$ 150mm(野村化学公司)

[0268] 柱温:40 $^{\circ}$ C

[0269] 流动相:

[0270] (流动相A)5mmol/L七氟丁酸水

[0271] (流动相B)5mmol/L七氟丁酸乙腈

[0272] 流动相A与B的混合比

[0273] (0~5分钟)100:0

[0274] (5~25分钟)100:0至50:50

[0275] (25~30分钟)50:50

[0276] (30~31分钟)50:50至100:0

[0277] (31~35分钟)100:0

[0278] 流速:0.25mL/分钟

[0279] 检测:正离子模式

[0280] 检测离子:

[0281] (1,4-双(氨甲基)环己烷)143.1 $>$ 67.0m/z

[0282] (4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛)142.1m/z

[0283] (4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸)158.2 $>$ 95.0m/z

[0284] 以下示出实施例的详细情况,但是本发明不受这些实施例限定。

[0285] 实施例

[0286] [实施例1]具有1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移活性的酶(AT)的探索

[0287] (1)要评价的AT的选择

[0288] 截至目前为止,具有使1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移而生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的氨基转移活性的酶尚属未知。本发明人为了探索具有对作为非天然化合物的1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移活性的酶,以能够在严苛环境中生长繁殖的恶臭假单胞菌(*Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104: 7745-7766)中已公开了基因组信息的恶臭假单胞菌KT2440的基因组的被注释为氨基转移酶的33个酶为对象,通过以氨基转移活性为指标的预备试验选择出可能具有目标活性的酶PpAT8(序列号1)和PpAT2(序列号2)。另外,将作为与PpAT8具有65%的一致性的同源酶的杀鲑气单胞菌杀鲑亚种来源的氨基转移酶AsAT5(序列号3)也作为评价对象。此外,将已报道过对与1,4-双(氨甲基)环己烷同样地在一分子内具有两个氨基的腐胺和尸胺的氨基转移活性的、大肠杆菌K12 MG1655来源的腐胺氨基转移酶PatA(*Journal of Bacteriology*, 2012, 194, 15: 4080-4088)(序列号4)作为评价对象。

[0289] (2)AT表达株的制作

[0290] 将由表1的“引物组”所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,将表1的“模板”中记载的DNA作为模板,进行PCR而得到各扩增DNA片段。各种染色体DNA通过常规方法制备。需要说明的是,本实施例中使用的基因序列全部从National Center for Biotechnology Information的数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)获得。另外,本实施例的PCR全部使用PrimeSTAR(商标)MAX DNA聚合酶(宝生物公司)按照说明书进行反应。

[0291] [表1]

[0292]	引物组 (序列号)	模板	扩增DNA片段
	11 和 12	恶臭假单胞菌 KT2440 的染色体DNA	PpAT8 (序列号5)
	13 和 14	恶臭假单胞菌 KT2440 的染色体DNA	PpAT2 (序列号6)
	15 和 16	杀鲑气单胞菌杀鲑亚种的染色体DNA	AsAT5 (序列号7)
	17 和 18	大肠杆菌 K12 MG1655的染色体DNA	PatA (序列号8)

[0293] 将由序列号9和10所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,将含有T5启动子和N末端His标签序列的质粒pQE80L(QIAGEN公司制)作为模板,进行PCR而得到约4.7kb的载体片段。需要说明的是,序列号9所示的碱基序列的5'末端含有与序列号11、13、15和17所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与序列号12、14、16和18所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0294] 将上述得到的各种扩增DNA片段和载体片段用In-Fusion HD克隆试剂盒(宝生物公司制)连接,由此制作表达各种AT的质粒pQE80L-PpAT8(图2)、pQE80L-PpAT2、pQE80L-AsAT5和pQE80L-PatA。使用所得到的AT表达质粒pQE80L-PpAT8、pQE80L-PpAT2、pQE80L-

AsAT5和pQE80L-PatA转化大肠杆菌BL21 (DE3),由此制作具有各种质粒的重组大肠杆菌。

[0295] (3)AT的表达和酶纯化

[0296] 将上述(2)中得到的各种重组大肠杆菌接种到装有2mL含有100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的试管中,在30℃下振荡培养16小时。将培养液接种到装有40mL含有100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的250mL容量的锥形瓶中,在30℃下振荡培养2小时后,以使终浓度达到1mM的方式添加异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),进一步在30℃下振荡培养5小时。对培养液进行离心分离,获得湿菌体。从该湿菌体中,使用TALON(商标)Metal Affinity Resin (Clontech公司)进行酶纯化,获得带有His标签的重组型的纯化酶PpAT8、PpAT2、AsAT5和PatA。

[0297] (4)对1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移活性的评价

[0298] 对于(3)中纯化而得到的各纯化酶,以4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的生成量为指标评价各种AT的酶活性。

[0299] 制备含有上述(3)中获得的纯化酶(PpAT8、PpAT2、AsAT5或PatA)0.07mg、50mM的MOPS(pH7.8)、10mM的氯化镁、1mM的二硫苏糖醇(DTT)、10mM的丙酮酸、0.1mM的磷酸吡哆醛(PLP)以及10mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)的0.1mL反应液(pH7.8),在30℃、400rpm的条件下进行反应24小时。另外,对于作为阴性对照的代替纯化酶液而添加了等量的MOPS缓冲液的反应液,也同样地进行反应。

[0300] 反应结束后,将反应液稀释,然后进行离心分离,利用LCMS-8040分析上清中所含的反应生成物和残存底物(图3)。作为生成物的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的反式体或顺式体的各峰根据其洗脱位置和m/z值来综合判断,各自的生成量以峰面积(面积值)来表示。将结果示于表2。

[0301] [表2]

AT	残存底物 (mM)	4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成量(面积值)	
		反式体	顺式体
— (阴性对照)	9.2	N.D.	N.D.
PpAT8	7.3	16079356	12472505
PpAT2	9.0	3194819	2482301
AsAT5	9.0	8037766	6369141
PatA	4.6	29942199	29023216

[0303] 仅在添加PpAT8、PpAT2、AsAT5或PatA进行反应的情况下,确认到了4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的生成、蓄积。其中,PatA的情况下残存底物少且4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的生成量最多。由此可知,大肠杆菌K12 MG1655来源的腐胺氨基转移酶PatA对1,4-双(氨甲基)环己烷具有高的氨基转移活性。

[0304] <AT同源物对1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移活性的评价>

[0305] (5)数据库中的AT同源酶的探索

[0306] 以实施例1中作为具有对1,4-双(氨甲基)环己烷的活性的AT而得到的PpAT8和PatA的氨基酸序列(序列号5和8)为查询(クエリー),使用National Center for

Biotechnology Information的蛋白质序列数据库BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)的同源检索功能,探索与各查询酶的一致性为40~85%的酶。将通过上述操作提取出的酶的氨基酸序列(序列号103~107)和编码各酶的碱基序列(序列号108~112)示于表3。

[0307] [表3]

查询	同源物	一致性 (%)	来源微生物	氨基酸序列	碱基序列
[0308]	PcAT	84.8	绿针假单胞菌产金色亚种 (<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>aureofaciens</i>) NBRC 3521	序列号 103	序列号 108
	PaAT	76.4	铜绿假单胞菌PAO1	序列号 104	序列号 109
	HeAT1	63.4	伸长盐单胞菌 (<i>Halomonas elongata</i>) DSM 2581	序列号 105	序列号 110
	HeAT2	41.2	伸长盐单胞菌DSM 2581	序列号 106	序列号 111
	PatA	41.5	乙酸甲烷八叠球菌 (<i>Methanosarcina acetivorans</i>) C2A	序列号 107	序列号 112

[0309] (6)AT同源物表达株的制作

[0310] 为了得到上述表3中记载的各AT同源酶的基因片段,使用表4所示的模板、引物1和2进行PCR反应。各种染色体DNA通过常规方法制备。此时,序列号9所示的碱基序列的5'末端含有与表4的各引物1所示的碱基序列的5'末端互补的碱基序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与表4的各引物2所示的碱基序列的5'末端互补的碱基序列。

[0311] [表4]

查询	同源物	模板	引物 1	引物 2
[0312]	PcAT	绿针假单胞菌产金色亚种 NBRC 3521 染色体 DNA	序列号 113	序列号 114
	PaAT	铜绿假单胞菌PAO1 染色体 DNA	序列号 115	序列号 116
	HeAT1	伸长盐单胞菌 DSM 2581 染色体 DNA	序列号 117	序列号 118
	HeAT2	伸长盐单胞菌 DSM 2581 染色体 DNA	序列号 119	序列号 120
	PatA	乙酸甲烷八叠球菌 C2A 染色体 DNA	序列号 121	序列号 122

[0313] 将通过上述PCR得到的扩增DNA片段和实施例1中制备的pQE80L的载体片段分别用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此制作各AT表达质粒。使用所得到的各表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),由此制作具有各AT表达质粒的重组大肠杆菌。

[0314] (7)AT同源物对1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移活性的评价

[0315] 使用上述(6)中得到的具有各AT表达质粒的重组大肠杆菌,通过与(3)同样的方法获得带有His标签的重组型的各AT纯化酶。

[0316] 制备含有所获得的各纯化酶0.07mg、50mM的MOPS(pH7.8)、1mM的氯化镁、1mM的DTT、1mM的丙酮酸、0.1mM的PLP以及1mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)的0.1mL反应液(pH7.8),在30℃、400rpm的条件下进行反应24小时。另外,对于作为阴性对照的代替纯化酶而添加了等量的MOPS缓冲液的反应液、作为阳性对照的使用了纯化酶PatA的反应液,也同样地进行反应。

[0317] 反应结束后,通过与(4)同样的方法对反应生成物进行分析。将结果示于表5。

[0318] [表5]

[0319]

AT	残存底物 (mM)	4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成量 (面积值)	
		反式体	顺式体
— (阴性对照)	1.26	N.D.	N.D.
PcAT	1.01	1972463	4143361
PaAT	0.76	2156060	8886741
HeAT1	0.87	831663	3931875
HeAT2	1.22	N.D.	N.D.
MaAT	1.29	N.D.	N.D.
PatA (阳性对照)	0.75	2085188	9881719

[0320] 确认了PcAT、PaAT和HeAT1具有对1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移活性而使4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成、蓄积。可知其中PaAT具有与PatA相匹敌的活性。另外,启示了PpAT8的同源物在与PpAT8的一致性为60%以上时具有目标活性。

[0321] [实施例2]4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛产生步骤中pH的影响

[0322] (1)氨基转移反应中溶液pH的影响的评价

[0323] 对在作为4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的中间体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的供给中pH条件(pH7.0或pH9.0)的影响进行评价。

[0324] 制备含有实施例1(3)中获得的PatA纯化酶0.07mg、50mM的MOPS(pH7.0)或50mM的CHES(pH9.0)、1mM的氯化镁、1mM的DTT、1mM的丙酮酸、0.1mM的PLP以及作为反应底物的1mM的顺式体或反式体的1,4-双(氨甲基)环己烷的0.1mL反应液,在30℃、400rpm的条件下进行反应24小时。

[0325] 反应结束后,使用LCMS-8040(岛津制作所制)分析反应液的上清中所含的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛。4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的反式比率(中间体反式比率)基于生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的面积值使用数学式1所示的计算式计算。式中的反式体是指反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛,顺式体是指顺式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛。将结果示于表6。

[0326] [数学式1]

[0327] 中间体反式比率(%) = {反式体的面积值 / (反式体的面积值 + 顺式体的面积值)} × 100

[0328] [表6]

底物	pH	4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛生成量 (面积值)		中间体反式比率 (%)
		反式	顺式	
顺式体	7.0	240436	14223981	1.7
	9.0	2210679	3469878	38.9
反式体	7.0	3795074	207188	94.8
	9.0	3851428	1671628	69.7

[0330] 表明了,在使用顺式体或反式体中的任一种底物的情况下,在pH7.0时,生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的约95%以上具有与所添加的底物相同的立体结构。另一方面,在pH9.0时,生成了30%以上的具有所添加的底物的异构体结构的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛。

[0331] 该结果启示了,在1,4-双(氨甲基)环己烷的氨基转移反应中,生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的立体结构根据反应溶液的pH而变化。

[0332] 认为上述立体结构的变化是(i)氨基转移酶的作用所引起的、(ii)醛基的酮-烯醇互变异构所引起的。关于(ii),4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛具有醛基,已知通常醛基在酸性或碱性催化剂存在下会在酮式与烯醇式之间相互转化(酮-烯醇互变异构)。认为由于4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛基从酮式转化为烯醇式, α 位碳上的氢转移并在与环己烷之间生成碳-碳双键,从而顺式体与反式体的区别消失。因此预测,在酸或碱存在下,会独立于利用氨基转移酶的反应而发生4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的异构化反应。因此,为了确认上述立体结构的变化是否依赖于氨基转移酶,进行了以下的试验。

[0333] (2)4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的pH依赖性异构化的评价

[0334] 按照上述(1),分别制备(i)通过在pH7.0的条件下使PatA纯化酶与顺式体底物反应而中间体反式比率达到2.1%的反应液、(ii)通过在pH7.0的条件下使PatA纯化酶与反式体底物反应而中间体反式比率达到95.3%的反应液。使用Amicon(商标)Ultra 0.5mL、3K(Millipore公司制)除去各反应液中的酶,回收流穿级分。对于各流穿级分10 μ L,添加50mM的乙酸钠缓冲液(pH4.0或pH5.0)、50mM的MES缓冲液(pH6.0)、50mM的磷酸钠缓冲液(pH6.0或pH7.0)、50mM的MOPS缓冲液(pH7.0)、50mM的CHES缓冲液(pH9.0或10.0)或者50mM的碳酸钠缓冲液(pH9.0或10.0)中的任一缓冲液90 μ L,在30°C、400rpm的条件下反应20小时。

[0335] 另外,为了评价添加仲胺对异构化的影响,也在向上述组成中添加了50mM的L-脯氨酸的条件下同样地进行反应。反应结束后,通过与上述(1)同样的方法对反应生成物进行分析并计算出中间体反式比率。将结果示于表7。

[0336] 「表7」

[0337]

底物	pH	缓冲液	L-脯氨酸	中间体反式比率 (%)
顺式体	4	乙酸钠	-	1.7
	5	乙酸钠	-	3.1
	6	MES	-	3.2
		磷酸钠	-	7.3
		磷酸钠	+	10.0
	7	MOPS	-	3.6
		磷酸钠	-	16.3
		磷酸钠	+	24.0
	9	CHES	-	47.8
		碳酸氢钠	-	22.6
		碳酸氢钠	+	63.4
	10	CHES	-	63.4
		碳酸氢钠	-	63.1
		碳酸氢钠	+	66.5
反式体	4	乙酸钠	-	100
	5	乙酸钠	-	100
	6	MES	-	91.1
		磷酸钠	-	87.2
		磷酸钠	+	88.8
	7	MOPS	-	94.5
		磷酸钠	-	85.0
		磷酸钠	+	75.7
	9	CHES	-	67.9
		碳酸氢钠	-	79.5
		碳酸氢钠	+	60.8
	10	CHES	-	63.9
		碳酸氢钠	-	64.7
		碳酸氢钠	+	65.1

[0338] 根据表7,在使用顺式体或反式体中的任一种底物的情况下,在pH4~6的酸性条件下时均几乎未发生中间体的异构化,但在pH7以上时观察到了中间体反式比率的变化。尤其是在pH9~10的碱性条件下,中间体的异构化显著地进行。此外,观察到4-(氨基甲基)环己烷-1-甲醛的异构化在反式比率为约60%时达到平衡。

[0339] 另外可知,在添加脯氨酸的条件下,在pH4~6时几乎未观察到变化,但是在pH7时观察到中间体的异构化进行的倾向,在pH9时中间体的异构化进一步被促进。

[0340] 以上表明,不论有无酶,在中性或碱性条件下均发生4-(氨基甲基)环己烷-1-甲醛的异构化。另外可知,在中性或碱性条件下的异构化反应在L-脯氨酸等仲胺共存下得到了促进。

[0341] 上述结果启示了,通过根据所使用的底物的立体结构改变pH条件,能够控制反应生成物的立体结构模式。

[0342] [实施例3]醛脱氢酶(ALDH)的活性的评价

[0343] (1) 要评价的ALDH的选择

[0344] 截至目前为止,具有使4-(氨基甲基)环己烷-1-甲醛的醛基氧化而生成4-(氨基甲基)环己烷甲酸的醛脱氢酶活性的酶尚属未知。

[0345] 本发明中,基于实施例1的结果而选择与PatA同样地参与腐胺和尸胺的代谢的大肠杆菌K12 MG1655来源的NAD⁺依赖型 γ -氨基丁醛脱氢酶PatD(FEBS Letters, 2005, 579:

4107-4112)作为评价对象ALDH。另外,基于作为底物的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛具有体积大且极性低的环己烷环结构这一点,选择已报道过对立体结构不同但具有体积大且极性低的苯环结构的底物的ALDH活性的、恶臭假单胞菌CSV86来源的NAD⁺依赖型苯甲醛脱氢酶XylC(Arch.Microbiol.,2011,193:553-563)、恶臭假单胞菌S12来源的NAD⁺依赖型苯乙醛脱氢酶StyD(Archives of Biochemistry and Biophysics,2017,616:47-58)和恶臭假单胞菌NCIMB 9866来源的NADP⁺依赖型4-羟基苯甲醛脱氢酶PchA(Appl.Microbiol.Biotechnol.,2014,98:1349-1356)作为评价对象ALDH。

[0346] (2)ALDH表达株的制作

[0347] 将(1)中选择的ALDH(PatD、XylC、StyD和PchA)的氨基酸序列示于序列号19~22。将编码这些酶的碱基序列分别示于序列号23~26。如下制作表达这些酶的菌株。

[0348] 将表8的“模板”中记载的DNA作为模板,将由表8的“引物组”所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR而扩增各DNA片段。

[0349] [表8]

[0350]	引物组 (序列号)	模板	扩增DNA片段
	27 和 28	大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA	PatD (序列号23)
	29 和 30	序列号24所示的DNA	XylC (序列号24)
	31 和 32	序列号25所示的DNA	StyD (序列号25)
	33 和 34	序列号26所示的DNA	PchA (序列号26)

[0351] 大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA通过常规方法制备。序列号24所示的DNA为编码序列号20所示的恶臭假单胞菌CSV86来源的XylC的基因的碱基序列,通过人工合成而制备。序列号25所示的DNA为编码序列号21所示的恶臭假单胞菌S12来源的StyD的基因的碱基序列,通过人工合成而制备。序列号26所示的DNA为编码序列号22所示的恶臭假单胞菌NCIMB 9866来源的PchA的基因的碱基序列,通过人工合成而制备。

[0352] 序列号9所示的碱基序列的5'末端含有与序列号27、29、31和33的5'末端互补的序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与序列号28、30、32和34所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0353] 将上述得到的各种扩增DNA片段和实施例1中制备的pQE80L载体片段用In-Fusion HD克隆试剂盒(宝生物公司制)连接,由此制作表达各种ALDH的质粒pQE80L-PatD、pQE80L-XylC、pQE80L-StyD和pQE80L-PchA。

[0354] 使用上述得到的表达ALDH的质粒pQE80L-PatD、pQE80L-XylC、pQE80L-StyD和pQE80L-PchA转化大肠杆菌BL21(DE3),由此制作具有各种质粒的大肠杆菌。

[0355] (3)ALDH的表达和酶纯化

[0356] 使用上述(2)中得到的菌株,通过与实施例1同样的方法获得湿菌体并进行酶纯化,由此获得带有His标签的重组型的纯化酶PatD、XylC、StyD和PchA。

[0357] (4) 基于与AT的组合反应的、ALDH的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率的评价

[0358] <使用NAD⁺作为ALDH的辅酶的情况>

[0359] 制备含有上述(3)中获得的纯化酶(PatD、XylC、StyD和PchA) 0.07mg、实施例1(3)中获得的PatA 0.07mg、50mM的MOPS (pH7.8)、1mM的氯化镁、1mM的DTT、1mM的丙酮酸、0.1mM的PLP、2mM的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)以及1mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)的0.1mL反应液(pH7.8),在30°C、400rpm的条件下进行反应24小时。另外,对于作为阴性对照的代替纯化酶而添加了等量的MOPS缓冲液的反应液,也同样地进行反应。

[0360] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物进行分析。另外,对于生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸,为了确认能否选择性地生成氨甲环酸(TXA)或顺式-TXA,基于TXA和顺式-TXA的生成量使用下述的数学式2所示的计算式计算4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式比率(也称为AMCHA反式比率、AMCHA反式率)。需要说明的是,各化合物的浓度(mM)通过与浓度已知的标准品的面积值进行比较来计算。

[0361] [数学式2]

[0362]
$$\text{AMCHA反式率}(\%) = \{ \text{TXA}(\text{mM}) / (\text{TXA}(\text{mM}) + \text{顺式-TXA}(\text{mM})) \} \times 100$$
首先,将使用1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)作为底物时的结果示于表9。

[0363] [表9]

ALDH	生成量(mM)		AMCHA 反式比率(%)
	TXA	顺式-TXA	
- (阴性对照)	N.D.	N.D.	-
PatD	0.38	0.70	35
XylC	0.46	0.10	82
StyD	0.37	0.49	43
PchA	N.D.	N.D.	-

[0365] N.D.:检出限以下(S/N<3)

[0366] 根据表9可知,通过将PatA与PatD、XylC或StyD组合,能够以1,4-双(氨甲基)环己烷为底物使4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸生成、蓄积。

[0367] 另外,由于底物使用了顺式体和反式体的混合物,因此推测作为生成物的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸也为顺式体和反式体的混合物,但是实际结果是,生成的4-(氨甲基)环己烷甲酸的反式比率根据ALDH的种类而不同。该结果启示了ALDH具有底物选择性。特别是使用XylC的情况下,4-(氨甲基)环己烷甲酸的反式比率大,表明了能够选择性地与反式体的4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛反应。因此可以说,在想要由顺式体和反式体的混合物底物高效地生成TXA的情况下,XylC是有用的ALDH。

[0368] 然后,将仅使用1,4-双(氨甲基)环己烷的反式体作为底物时的结果示于表10。

[0369] [表10]

	ALDH	生成量(mM)	
		TXA	顺式-TXA
[0370]	- (阴性对照)	N.D.	N.D.
	PatD	0.88	N.Q.
	XylC	0.72	N.D.
	StyD	0.83	N.D.

[0371] N.Q.:定量限以下(S/N<10)、N.D.:检出限以下(S/N<3)

[0372] 根据表10的结果,在使用反式体作为底物的情况下,任一种ALDH均能够确认到TXA的生成,但是几乎检测不到顺式-TXA。因此,在使用反式体的底物的情况下,由于在此发现的任一种ALDH均能够以高收率生成TXA,因此表明了在使用反式体或富含反式体的底物作为底物是优选的。另外可知,这些ALDH能够接受反式体的底物。

[0373] 接着,对仅使用1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体作为底物时4-(氨甲基)环己烷甲酸的生成量进行评价。

[0374] 制备含有与上述同样地获得的纯化酶PatA和各种ALDH(PatD、XylC或StyD)各0.07mg、50mM的MOPS(pH7.8)、10mM的氯化镁、1mM的DTT、10mM的丙酮酸、0.1mM的PLP、2mM的NAD⁺以及10mM的顺式体的1,4-双(氨甲基)环己烷的0.1mL反应液,在30℃、400rpm的条件下进行反应24小时。将结果示于表11。

[0375] [表11]

	ALDH	生成量(mM)	
		TXA	顺式-TXA
[0376]	- (阴性对照)	N.D.	N.D.
	PatD	0.01	1.79
	XylC	0.46	0.90
	StyD	0.06	1.64

[0377] N.D.:检出限以下(S/N<3)

[0378] 由表11可知,在使用顺式体作为底物的情况下,任一种ALDH的情况下,生成的顺式-TXA的比例均变高。另外,XylC的情况下,顺式-TXA的生产量少,因此可知XylC不易接受顺式体底物。

[0379] 其中,仅在使用XylC的情况下以较高比例生成了TXA。推测这是由于,本反应在pH7.8的弱碱性条件下实施,因此发生了实施例2所示的碱性条件下的中间体异构化,即使在添加了顺式体的底物的情况下也生成反式体的中间体,结果是TXA大量蓄积。这启示了,在以生产TXA为目标的情况下,通过使用XylC作为ALDH选择性地氧化反式体的中间体而生

成TXA,同时在中性或碱性条件下使残存的顺式体的中间体动态地异构化为反式体,由此,即使在使用顺式体和反式体的混合物底物的情况下,理论上也有可能生成100%的TXA。

[0380] <使用NADP⁺作为ALDH的辅酶的情况>

[0381] 已知上述表6的结果中未能确认到ALDH活性的PchA利用NADP⁺作为辅酶(Appl.Microbiol.Biotechnol.,2014,98:1349-1356)。因此,使用上述(3)中获得的纯化酶PchA以及作为比较对象的XylC,评价使用NADP⁺作为辅酶时4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的醛氧化活性。

[0382] 制备代替上述的反应液组成中的NAD⁺而添加了1mM的NADP⁺的反应液,进行与上述同样的反应。作为底物,使用顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)。另外,对于作为阴性对照的代替纯化酶而添加了等量的MOPS缓冲液的反应液,也同样地进行反应。

[0383] 反应结束后,通过与上述同样的方法对反应生成物进行分析。将结果示于表12。

[0384] [表12]

ALDH	生成量(mM)		AMCHA 反式比率(%)
	TXA	顺式-TXA	
[0385] - (阴性对照)	N.D.	N.D.	-
PchA	0.06	0.16	27
XylC	0.17	0.01	94

[0386] N.D.:检出限以下(S/N<3)

[0387] 由表12确认了,PchA可以通过添加NADP⁺作为辅酶而生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。另外可知,虽然已知XylC为NAD⁺依赖性酶,但是在4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸生产中也可以利用NADP⁺作为辅酶。

[0388] [实施例4]使用ALDH同源物的4-(氨甲基)环己烷甲酸的生产

[0389] (1)数据库中的ALDH同源酶的探索

[0390] 以实施例3中作为能够生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的ALDH而获得的PatD、XylC和StyD的氨基酸序列(序列号19~21)为查询,使用National Center for Biotechnology Information的蛋白质序列数据库BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)的同源检索功能,探索与各酶的一致性为50~80%的酶。将通过上述操作提取出的酶的氨基酸序列(序列号35~46)和编码各酶的碱基序列(序列号47~58)示于表13。表13中,CkpatD、SepatD、CspatD和PppatD均是被注释为γ-氨基丁醛脱氢酶的蛋白质。SsBD、HaBD和RrAD是被注释为苯甲醛脱氢酶的蛋白质。PmsLAD是被注释为苯乙醛脱氢酶的蛋白质。其它是被注释为醛脱氢酶或其家族蛋白质的蛋白质。

[0391] [表13]

[0392]

查询	同源物	一致性 (%)	来源微生物	氨基酸序列	碱基序列
PatD	CkpatD	88.4	柯氏柠檬酸杆菌 ATCC BAA-895	序列号 35	序列号 47
	SepatD	83.3	肠沙门氏菌肠亚种猪霍乱血清型菌株 SC-B67	序列号 36	序列号 48
	PapatD	73.0	黑腐果胶杆菌 SCRI1043	序列号 37	序列号 49
	CspatD	83.3	阪崎克罗诺杆菌(<i>Cronobacter sakazakii</i>) ATCC 29544	序列号 38	序列号 50
	PppatD	71.1	恶臭假单胞菌KT2440	序列号 39	序列号 51
XylC	HaBD	84.2	<i>Halioxenophilus aromaticivorans</i>	序列号 40	序列号 52
	SsBD	72.4	鞘氨醇单胞菌属未定种 TF3	序列号 41	序列号 53
	RiAD	48.4	<i>Rhodococcus imtechensis</i>	序列号 42	序列号 54
	RrAD	49.7	赤红球菌	序列号 43	序列号 55
StyD	PmsLAD	86.9	假单胞菌属未定种 LQ26	序列号 44	序列号 56
	BIAD	69.9	宽广伯克霍尔德菌	序列号 45	序列号 57
	PbsAD	63.3	<i>Paraburkholderia</i> sp. 5N	序列号 46	序列号 58

[0393] (2) ALDH同源物表达株的制作

[0394] 为了得到上述表13中记载的各ALDH同源酶的基因片段,使用表14所示的模板、引物1和2进行PCR反应。

[0395] [表14]

[0396]

查询	同源物	模板	引物1	引物2
PatD	CkpatD	序列号 47	序列号 59	序列号 60
	SepatD	序列号 48	序列号 61	序列号 62
	PapatD	序列号 49	序列号 63	序列号 64
	CspatD	阪崎克罗诺杆菌 染色体 DNA	序列号 65	序列号 66
	PppatD	恶臭假单胞菌KT2440 染色体 DNA	序列号 67	序列号 68
XylC	HaBD	序列号 52	序列号 69	序列号 70
	SsBD	序列号 53	序列号 71	序列号 72
	RiAD	<i>Rhodococcus imtechensis</i> 染色体 DNA	序列号 73	序列号 74
	RrAD	赤红球菌 染色体 DNA	序列号 75	序列号 76
StyD	PmsLAD	序列号 56	序列号 77	序列号 78
	BIAD	序列号 57	序列号 79	序列号 80
	PbsAD	序列号 58	序列号 81	序列号 82

[0397] 各种染色体DNA通过常规方法制备。序列号47所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号35所示的柯氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter koseri*) ATCC BAA-895株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号48所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号36所示的肠沙门氏菌肠亚种猪霍乱血清型菌株(*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar *Choleraesuis* str.) SC-B67株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号49所示的

DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号37所示的黑腐果胶杆菌 (*Pectobacterium atrosepticum*) SCRI1043株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号52所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号40所示的 *Halioxenophilus aromaticivorans* 株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号53所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号41所示的鞘氨醇单胞菌属未定种 (*Sphingomonas* sp.) TF3株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号56所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号44所示的假单胞菌属未定种LQ26株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号57所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号45所示的宽广伯克霍尔德菌 (*Burkholderia lata*) 株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。序列号58所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号46所示的 *Paraburkholderia* sp.5N株来源的ALDH的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。

[0398] 此时,序列号9和表14的各引物1所示的碱基序列、序列号10和表14的各引物2所示的碱基序列在各自的5'末端含有互补的碱基序列。即,序列号9所示的碱基序列的5'末端含有与表14的各引物1所示的碱基序列的5'末端互补的碱基序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与表14的各引物2所示的碱基序列的5'末端互补的碱基序列。

[0399] 将通过上述PCR得到的扩增DNA片段和实施例1中制备的pQE80L的载体片段分别用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此制作各ALDH表达质粒。

[0400] 使用上述得到的各表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),由此制作具有各ALDH表达质粒的大肠杆菌。

[0401] (3)ALDH同源物的4-(氨甲基)环己烷甲酸的生产率的评价

[0402] 使用上述(2)中得到的具有各ALDH表达质粒的大肠杆菌,通过与实施例1同样的方法获得带有His标签的重组型的各ALDH纯化酶。

[0403] 制备含有所获得的纯化酶0.07mg、实施例1中获得的PatA 0.07mg、50mM的MOPS (pH7.8)、1mM的氯化镁、1mM的DTT、1mM的丙酮酸、0.1mM的PLP、1mM的NAD⁺以及1mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)的0.1mL反应液(pH7.8),在30°C、400rpm的条件下进行反应24小时。另外,对于作为阴性对照的代替纯化酶而添加了等量的MOPS缓冲液的反应液、作为阳性对照的使用了纯化酶Xy1C的反应液,也同样地进行反应。

[0404] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物进行分析。将结果示于表15。

[0405] [表15]

[0406]

查询	ALDH 同源物	一致性 (%)	生成量(mM)		AMCHA 反 式比率 (%)
			TXA	顺式-TXA	
—	— (阴性对照)	—	N.D.	N.D.	—
PatD	CkpatD	88.4	0.22	0.35	39
	SepatD	83.3	0.23	0.39	37
	CspatD	83.3	0.29	0.28	51
	PppatD	71.1	0.24	0.32	43
XylC	HaBD	84.2	0.33	0.06	85
	SsBD	72.4	0.20	0.03	87
	RiAD	48.4	0.02	0.02	50
	RrAD	49.7	0.01	0.01	50
StyD	PmsLAD	86.9	0.22	0.38	37
	BIAD	69.9	0.20	0.34	37
	PbsAD	63.3	0.21	0.37	36
—	XylC (阳性对照)	—	0.30	0.05	87

[0407] 由表15可知,在使用与PatD、XylC或StyD的一致性为约60%以上的ALDH的情况下,也能够生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。另外,在使用CspatD、HaBD或SsBD的情况下,生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式比率大于50%,可知这些酶为反式特异性高的酶。特别是在使用与XylC的一致性为70%以上的HaBD或SsBD的情况下,生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式比率为70%以上,可知这些酶与XylC同样特别地反式选择性地反应,即,具有特别高的反式。

[0408] [实施例5]基于导入辅酶再生系统的TXA生产率的评价

[0409] (1) 丙氨酸脱氢酶 (AlaDH) 表达株的制作

[0410] 为了得到编码序列号123所示的枯草芽孢杆菌168来源的丙氨酸脱氢酶的BsAlaDH的基因片段,将通过常规方法制备的枯草芽孢杆菌168的染色体DNA作为模板,使用序列号83和84所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到序列号124所示的BsAlaDH基因片段。序列号9所示的碱基序列的5'末端含有与序列号83所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与序列号84所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0411] 将通过上述PCR得到的BsAlaDH片段和实施例1中制备的pQE80L的载体片段分别用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pQE80L-BsAlaDH。

[0412] 使用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),得到BL21(DE3)/pQE80L-BsAlaDH。

[0413] (2) NADH氧化酶 (NOX) 表达株的制作

[0414] 为了得到编码序列号125所示的枯草芽孢杆菌168来源的NADH氧化酶的BsNOX的基因片段,将枯草芽孢杆菌168的染色体DNA作为模板,使用序列号85和86所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到序列号126所示的BsNOX基因片段。序列号9所示

的碱基序列的5'末端含有与序列号85所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与序列号86所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0415] 将通过上述PCR得到的BsNOX基因片段和实施例1中制备的pQE80L的载体片段分别用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)5连接,得到表达质粒pQE80L-BsNOX。

[0416] 使用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),得到BL21(DE3)/pQE80L-BsNOX。

[0417] (3)BsAlaDH和BsNOX的表达和酶纯化

[0418] 使用上述得到的BL21(DE3)/pQE80L-BsAlaDH和BL21(DE3)/pQE80L-BsNOX,通过与实施例1同样的方法获得带有His标签的重组型的酶纯化BsAlaDH和BsNOX。

[0419] (4)导入AlaDH和NOX后的TXA生成活性的评价

[0420] 制备含有实施例1中获得的PatA 0.07mg、实施例2中获得的XylC0.07mg、上述(3)中获得的BsAlaDH 0.07mg、BsNOX 0.07mg、50mM的MOPS(pH7.8)、1mM的氯化镁、1mM的DTT、1mM的丙酮酸、0.1mM的PLP、2mM NAD^+ 以及1mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)的0.1mL反应液(pH7.8),在30℃、400rpm的条件下进行反应24小时。

[0421] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物和残存底物进行分析。将结果示于表16。

[0422] [表16]

	再生酶		生成量(mM)		
	BsAlaDH	BsNOX	残存底物	TXA	顺式-TXA
[0423]	—	—	0.56	0.46	0.09
	+	+	0.13	0.71	0.27

[0424] 根据表16,在导入了辅酶再生系统BsAlaDH和BsNOX的情况下,底物消耗加速,4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率提高。

[0425] [实施例6]基于使用AT表达株和ALDH表达株的休止菌体反应的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产

[0426] 对于实施例1中制作的BL21(DE3)/pQE80L-PatA株和BL21(DE3)/pQE80L-XylC株,通过与实施例1(2)同样的方法获得湿菌体。向该湿菌体中以使终浓度达到10mL/L的方式添加二甲苯,在30℃、850rpm下进行30分钟的膜处理。

[0427] 制备含有50g/L的各膜处理后湿菌体、50mM MOPS(pH7.8)、350mM的葡萄糖、50mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)、50mM的氯化镁以及50mM的 NAD^+ 的0.4mL反应液,在30℃、850rpm的条件下进行反应24小时。

[0428] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物进行分析。其结果是,确认到了3.9mM的TXA和2.8mM的顺式-TXA的生成、蓄积。因此确认了,即使利用使用分别表达AT和ALDH的微生物菌体的休止菌体反应,也能够生成4-(氨甲基)环己烷甲酸。

[0429] [实施例7]基于使用AT和ALDH共表达株的休止菌体反应的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产

[0430] (1)AT和ALDH的共表达株的制作

[0431] i) BL21 (DE3) /pET28a-PatA-XylC株的制作

[0432] 将大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA作为模板,使用序列号89和90所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到PatA片段。接着,将序列号24所示的碱基序列作为模板,使用序列号91和92所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。需要说明的是,序列号90所示的碱基序列的5'末端含有与序列号91所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0433] 将上述得到的PatA片段和XylC片段的混合物作为模板,使用序列号89和92所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为PatA-XylC)片段。

[0434] 进而,将由序列号87和88所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,以表达载体pET28a(Novagen公司制)为模板,进行PCR反应而得到约5.2kb的载体片段。需要说明的是,序列号87所示的碱基序列的5'末端含有与序列号89所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号88所示的碱基序列的5'末端含有与序列号92所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0435] 将上述得到的PatA-XylC片段和载体片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pET28a-PatA-XylC(图4)。

[0436] 用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3),得到BL21 (DE3) /pET28a-PatA-XylC株。

[0437] ii) BL21 (DE3) /pET28a-XylC-PatA的制作

[0438] 将序列号24所示的碱基序列作为模板,使用序列号93和94所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。将大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA作为模板,使用由序列号95和96所示的碱基序列构成的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到PatA片段。需要说明的是,序列号94所示的碱基序列的5'末端含有与序列号95所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0439] 将上述得到的XylC片段和PatA片段的混合物作为模板,使用由序列号93和96所示的碱基序列构成的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为XylC-PatA)片段。需要说明的是,序列号87所示的碱基序列的5'末端含有与序列号93的5'末端互补的序列,序列号88所示的碱基序列的5'末端含有与序列号96所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0440] 将上述得到的XylC-PatA片段和上述i)中得到的载体片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pET28a-XylC-PatA。

[0441] 使用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌BL21 (DE3),得到BL21 (DE3) /pET28a-XylC-PatA株。

[0442] iii) BL21 (DE3) /pUC19-PatA-XylC株的制作

[0443] 将大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA作为模板,使用序列号99和90所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到PatA片段。接着,将序列号24所示的碱基序列作为模板,使用序列号91和100所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。需要说明的是,序列号90所示的碱基序列的5'末端含有与序列号91所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0444] 将上述得到的PatA片段和XylC片段的混合物作为模板,使用由序列号99和100所

示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为PatA-XylC)片段。

[0445] 将由序列号97和98所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,将表达载体pUC19(NIPPON GENE公司制)作为模板,进行PCR反应而得到约2.6kb的载体片段。需要说明的是,序列号97所示的碱基序列的5'末端含有与序列号99所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号98所示的碱基序列的5'末端含有与序列号100所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0446] 将上述得到的PatA-XylC片段和载体片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pUC19-PatA-XylC。

[0447] 用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),得到BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC株。

[0448] iv)BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA株的制作

[0449] 将序列号24所示的DNA作为模板,使用序列号101和94所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。接着,将大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA作为模板,使用序列号95和102所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到PatA片段。需要说明的是,序列号94所示的碱基序列的5'末端含有与序列号95所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0450] 将上述得到的XylC片段和PatA基因片段的混合物作为模板,使用序列号101和102所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为XylC-PatA)片段。需要说明的是,序列号97所示的碱基序列的5'末端含有与序列号101所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号98所示的碱基序列的5'末端含有与序列号102所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0451] 将上述得到的XylC-PatA片段和上述iii)中得到的pUC19的载体片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,得到表达质粒pUC19-XylC-PatA。

[0452] 使用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),得到BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA株。

[0453] (2)使用AT和ALDH的共表达株的菌体反应

[0454] 使用上述(1)中制作的BL21(DE3)/pET28a-PatA-XylC株、BL21(DE3)/pET28a-XylC-PatA株、BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC株和BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA株、以及作为阴性对照的BL21(DE3)株,评价基于休止菌体反应的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率。

[0455] 将各菌株接种到装有2mL含有30mg/L的卡那霉素或100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的试管中,在30℃下振荡培养16小时。将该培养液接种到装有40mL含有30mg/L的卡那霉素或100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的250mL容量的锥形瓶中,在30℃下振荡培养2小时后,以使终浓度达到1mM的方式添加IPTG,进一步在37℃下振荡培养5小时。另外,作为对照,将BL21(DE3)在不含卡那霉素和氨苄青霉素的培养基中同样地进行培养。

[0456] 对培养后的该培养液进行离心分离,获得湿菌体。向该湿菌体中以使终浓度达到10mL/L的方式添加二甲苯,在30℃、850rpm下进行30分钟的膜处理。

[0457] 制备含有100g/L的上述膜处理后湿菌体、50mM MOPS(pH7.8)、350mM的葡萄糖、50mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)、50mM的氯化

镁以及50mM的NAD⁺的0.4mL反应液,在30℃、850rpm的条件下进行反应24小时。

[0458] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物进行分析。将结果示于表17。

[0459] [表17]

	微生物	生成量 (mM)	
		TXA	顺式-TXA
	BL21(DE3)	N.D.	N.D.
[0460]	BL21(DE3)/pET28a-PatA-XylC	5.6	0.9
	BL21(DE3)/pET28a-XylC-PatA	9.2	0.8
	BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC	8.3	1.1
	BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA	8.6	1.7

[0461] N.D.:检出限以下 (S/N<3)

[0462] 由表17确认了,即使利用使用共表达PatA和XylC的菌株的休止菌体反应,也能够生成4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

[0463] 进而,对从上述反应液中除去了NAD⁺的情况下的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率进行评价。反应条件按照上述。将结果示于表18。

[0464] [表18]

	微生物	生成量 (mM)	
		TXA	顺式-TXA
	BL21(DE3)	N.D.	N.D.
[0465]	BL21(DE3)/pET28a-PatA-XylC	1.0	0.1
	BL21(DE3)/pET28a-XylC-PatA	2.7	0.2
	BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC	4.1	0.2
	BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA	3.0	0.4

[0466] N.D.:检出限以下 (S/N<3)

[0467] 在从反应液中除去了NAD⁺的情况下,4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生成量减少。由此启示了,在基于休止菌体反应的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产中,辅酶的供给是重要的。

[0468] [实施例8]基于使用AT和ALDH的共表达株的添加培养的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产

[0469] 使用实施例7中制作的BL21 (DE3) /pUC19-PatA-XylC株、BL21 (DE3) /pUC19-XylC-PatA株和作为阴性对照的BL21 (DE3) 株,评价基于添加培养法的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率。

[0470] 将各菌株接种到装有2mL含有100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的试管中,在30℃下振荡培养16小时。BL21 (DE3) 株在不含氨苄青霉素的培养基中同样地进行培养。将该培养液接种到装有4mL含有30mg/L的100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的大试管中,在30℃下培养5小时后,添加终浓度为1mM的IPTG和1g/L的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的

混合物(反式比率45.7%),进一步在37℃下培养24小时。

[0471] 培养结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物进行分析。将结果示于表19。

[0472] [表19]

	微生物	生成量(μM)
		TXA
[0473]	BL21(DE3)	4
	BL21(DE3)/pUC19-PatA-XylC	133
	BL21(DE3)/pUC19-XylC-PatA	27

[0474] 由表19确认了,通过添加培养法也能够生成TXA。

[0475] [实施例9]使用ALDH同源物的4-(氨甲基)环己烷甲酸的生产

[0476] (1)ALDH同源酶的探索

[0477] 以实施例3中作为对反式体底物具有高选择性的ALDH的XylC的氨基酸序列(序列号20)为查询,使用National Center for Biotechnology Information的蛋白质序列数据库BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)的同源检索功能,选择与XylC的一致性为50%以上且检索结果中的同源酶彼此的一致性低于90%者。将通过上述操作提取出的酶的氨基酸序列(序列号127~139)示于表20。

[0478] [表20]

[0479]

ALDH 同源物	一致性 (%)			来源微生物	氨基酸序列 (序列号)
	相对于XylC	相对于HaBD	相对于SsBD		
1	68.0	65.3	76.0	Hydrogenophaga aromaticivorans	127
2	99.0	84.0	70.8	铜绿假单胞菌	128
3	87.1	80.1	69.2	假单胞菌属未定种 MAP12	129
4	82.6	92.2	67.8	交替单胞菌	130
5	81.3	80.7	71.3	Tepidiphilus succinatimandens	131
6	51.8	52.2	57.9	渴望盐单胞菌	132
7	52.5	52.0	58.6	荧光假单胞菌	133
8	57.3	55.9	63.9	Glaciimonas immobilis	134
9	58.7	57.1	64.5	Paraburkholderia unamae	135
10	55.1	54.7	57.8	油田水海杆菌	136
11	57.6	56.4	63.0	Aromatoleum toluclasticum	137
12	58.9	57.2	64.9	Ideonella livida	138
13	58.7	56.5	62.2	伯克霍尔德菌属未定种_D7	139

[0480] 表20的ALDH同源物1~11和13均是被注释为苯甲醛脱氢酶的蛋白质,ALDH同源物12是被注释为醛脱氢酶家族蛋白质的蛋白质。

[0481] (2) ALDH同源物表达株的制作

[0482] 为了得到上述表20中记载的各ALDH同源酶的基因片段,使用表21所示的模板、引物1和2进行PCR反应。此时,序列号9所示的碱基序列的5'末端含有与表21的各引物1所示的碱基序列的5'末端互补的碱基序列,序列号10所示的碱基序列的5'末端含有与表21的各引物2所示的碱基序列的5'末端互补的碱基序列。

[0483] [表21]

ALDH 同源物	来源微生物	序列号		
		模板	引物1	引物2
1	Hydrogenophaga aromaticivorans	140	153	154
2	铜绿假单胞菌	141	155	156
3	假单胞菌属未定种 MAP12	142	157	158
4	交替单胞菌	143	159	160
5	Tepidiphilus succinatimandens	144	161	162
6	渴望盐单胞菌	145	163	164
7	荧光假单胞菌	146	165	166
8	Glaciimonas immobilis	147	167	168
9	Paraburkholderia unamae	148	169	170
10	油田水海杆菌	149	171	172
11	Aromatoleum toluclasticum	150	173	174
12	Ideonella livida	151	175	176
13	伯克霍尔德菌属未定种_D7	152	177	178

[0485] 序列号140~152所示的DNA是为了在大肠杆菌中表达而对编码序列号127~139所示的ALDH同源酶的基因的碱基序列进行了密码子优化的DNA,通过人工合成而制备。

[0486] 将通过上述PCR得到的扩增DNA片段和实施例1中制备的pQE80L的载体片段分别用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此制作各ALDH表达质粒。使用上述得到的各表达质粒转化大肠杆菌BL21(DE3),由此制作具有各ALDH表达质粒的大肠杆菌。

[0487] (3) ALDH同源物的4-(氨甲基)环己烷甲酸的生产率的评价

[0488] 使用上述(2)中得到的具有各ALDH表达质粒的大肠杆菌,通过与实施例1同样的方法获得带有His标签的重组型的各ALDH纯化酶。

[0489] 制备含有所获得的纯化酶0.07mg、实施例1中获得的PatA0.07mg、50mM的CHES(pH9.0)、10mM的氯化镁、1mM的DTT、1mM的丙酮酸、0.1mM的PLP、1mM的NAD⁺以及1mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)的0.1mL反应液(pH7.8),在30°C、400rpm的条件下进行反应24小时。另外,对于作为阳性对照的使用了纯化酶Xy1C的反应液,也同样地进行反应。

[0490] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物进行分析。将结果示于表22。

[0491] [表22]

[0492]

ALDH 同源物	一致性(%)			生成量(mM)		AMCHA 反式比率 (%)
	相对于 XylC	相对于 HaBD	相对于 SsBD	TXA	顺式— TXA	
1	68.0	65.3	76.0	0.25	0.04	85
2	99.0	84.0	70.8	0.45	0.17	72
3	87.1	80.1	69.2	0.50	0.35	59
4	82.6	92.2	67.8	0.59	0.06	90
5	81.3	80.7	71.3	0.55	0.23	71
6	51.8	52.2	57.9	0.02	0.04	39
7	52.5	52.0	58.6	0.11	0.03	78
8	57.3	55.9	63.9	0.22	0.46	32
9	58.7	57.1	64.5	0.19	0.21	48
10	55.1	54.7	57.8	0.01	0.01	54
11	57.6	56.4	63.0	0.03	0.02	59
12	58.9	57.2	64.9	0.04	0.06	41
13	58.7	56.5	62.2	0.18	0.16	53
XylC	100	84.2	74.2	0.57	0.18	76

[0493] 根据表22,所评价的所有ALDH同源物1~13均能够确认到4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生成。尤其是在使用ALDH同源物1~5、7~9、13的情况下,能够确认到4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的显著的生成。另外,在使用ALDH同源物1~5、7、13的情况下,生成的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式比率大于50%,对反式体底物具有高的特异性。其中,特别是ALDH同源物1、2、4、5、7,4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的反式比率为70%以上,可知具有与XylC相匹敌的对反式体底物的特别高的选择性。其中,ALDH同源物4和5的情况下,生成了与XylC同等量的反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸。

[0494] [实施例10]基于酮酸和辅酶的供给强化的TXA生产率的评价

[0495] (1) 评价株的制作

[0496] i) MG1655/pQE80L-XylC-PatA的制作

[0497] 将序列号24所示的碱基序列作为模板,使用序列号179和94所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。接着,将大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA作为模板,使用序列号95和180所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到PatA片段。需要说明的是,序列号94所示的碱基序列的5'末端含有与序列号95所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0498] 将上述得到的XylC片段和PatA片段的混合物作为模板,使用序列号179和180所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为

XylC-PatA) 片段。

[0499] 进而,将由序列号181和182所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,以表达载体pQE80L(QIAGEN公司制)为模板,进行PCR反应而得到约4.7kb的载体片段。需要说明的是,序列号181所示的碱基序列的5'末端含有与序列号179所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号182所示的碱基序列的5'末端含有与序列号180所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0500] 将上述得到的XylC-PatA片段和载体片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pQE80L-XylC-PatA。用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌MG1655,得到MG1655/pQE80L-XylC-PatA株。

[0501] ii)MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XylC-BsNOX的制作

[0502] 将大肠杆菌K12 MG1655的染色体DNA作为模板,使用序列号183和90所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到PatA片段。接着,将序列号24所示的碱基序列作为模板,使用序列号91和30所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。需要说明的是,序列号90所示的碱基序列的5'末端含有与序列号91所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0503] 将上述得到的PatA片段和XylC片段的混合物作为模板,使用序列号183和30所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为PatA-XylC)片段。

[0504] 进而,将由序列号181和182所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,以表达载体pQE80L(QIAGEN公司制)为模板,进行PCR反应而得到约4.7kb的载体片段。需要说明的是,序列号181所示的碱基序列的5'末端含有与序列号183所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号182所示的碱基序列的5'末端含有与序列号30所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0505] 将上述得到的PatA片段和载体片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到质粒pQE80L-PatA-XylC。将上述得到的质粒作为模板,将由序列号184和182所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR反应而得到DNA(以下称为pQE80L-PatA)片段。

[0506] 将枯草芽孢杆菌168的染色体DNA作为模板,使用序列号185和186所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到BsAlaDH基因片段。将枯草芽孢杆菌168的染色体DNA作为模板,使用序列号187和86所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到BsNOX基因片段。需要说明的是,序列号186所示的碱基序列的5'末端含有与序列号187所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0507] 将上述得到的BsAlaDH基因片段和NOX基因片段的混合物作为模板,使用序列号185和86所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到2片段连接而成的DNA(以下称为BsAlaDH-BsNOX)片段。

[0508] 需要说明的是,序列号185所示的碱基序列的5'末端含有与序列号184所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号86所示的碱基序列的5'末端含有与序列号182所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0509] 将上述得到的pQE80L-PatA片段和BsAlaDH-BsNOX片段用In-Fusion(商标)HD克隆

试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到质粒pQE80L-PatA-BsAlaDH-BsNOX。

[0510] 将上述得到的质粒作为模板,将由序列号188和189所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR反应而得到DNA(以下称为pQE80L-PatA-BsAlaDH-BsNOX)片段。

[0511] 将序列号24所示的碱基序列作为模板,使用序列号190和94所示的碱基序列的寡核苷酸作为引物组,进行PCR反应而得到XylC片段。

[0512] 需要说明的是,序列号188所示的碱基序列的5'末端含有与序列号190所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号189所示的碱基序列的5'末端含有与序列号94所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0513] 将上述得到的pQE80L-PatA-BsAlaDH-BsNOX片段和XylC片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pQE80L-PatA-BsAlaDH-XylC-BsNOX。

[0514] 用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌MG1655,得到MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XylC-BsNOX株。

[0515] iii)MG1655 Δ aceE/pQE80L-patA-xylC-ald-nox株的制作

[0516] <基因缺损时用作标记的DNA片段的获得>

[0517] 将由序列号191和192所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,将pCatSac (Appl Environ Microbiol (2013) 79, 3033-3039)作为模板,进行PCR而得到含有氯霉素抗性cat基因和蔗糖敏感性sacB基因的cat-sacB片段。

[0518] <丙酮酸脱氢酶活性丧失的大肠杆菌的制作>

[0519] 通过以下方法制作编码丙酮酸脱氢酶的DNA(以下称为aceE基因)缺损的大肠杆菌。将通过常规方法制备的大肠杆菌MG1655株的基因组DNA作为模板,将由表23的“引物组”所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR而扩增各DNA片段。

[0520] [表23]

[0521]

引物组 (序列号)	扩增DNA片段	备注
193 和 194	aceE上游1	序列号191和序列号194所示的碱基序列的5'末端的序列互补。
195 和 196	aceE下游1	序列号192和序列号195所示的碱基序列的5'末端的序列互补。
193 和 197	aceE上游2	序列号197和序列号198所示的碱基序列的5'末端的序列互补。
198 和 196	aceE下游2	

[0522] aceE上游1和aceE上游2含有从aceE基因的起始密码子至起始密码子上游约1000bp为止的区域。aceE下游1和aceE下游2含有从aceE基因的终止密码子下游约50bp至约1000bp为止的区域。

[0523] 将使aceE上游1、aceE下游1和cat-sacB片段以等摩尔的比率混合后的物质作为模板,使用由序列号193和196所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR而得到由在

aceE基因周边区域的序列中插入了cat-sacB片段的序列构成的DNA(以下称为aceE::cat-sacB)片段。

[0524] 将使aceE上游2和aceE下游2以等摩尔的比率混合后的物质作为模板,使用由序列号193和196所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR而得到由不含aceE且aceE上游与aceE下游直接连接而成的序列构成的DNA(以下称为 Δ aceE)片段。

[0525] 通过电穿孔法将aceE::cat-sacB片段导入保有含有编码 λ 重组酶的基因的质粒pKD46[Datsenko, K.A., Warner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 97, 6640-6645 (2000)]的MG1655株,得到显示出氯霉素抗性以及蔗糖敏感性的转化体(aceE基因被置换为aceE::cat-sacB的转化体)。

[0526] 将 Δ aceE片段通过电穿孔法导入到该转化体中,得到显示氯霉素敏感性以及蔗糖抗性的转化体(aceE::cat-sacB被置换为 Δ aceE的转化体)。由它们进一步得到显示氨苄青霉素敏感性的转化体(pKD46丢失的转化体)。将该转化体命名为MG1655 Δ aceE。

[0527] <表达质粒的获得>

[0528] 将ii)中得到的质粒pQE80L-PatA-XylC作为模板,使用由序列号199和182所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR而得到DNA(以下称为pQE80L-PatA-XylC)片段。

[0529] 将ii)中得到的BsAlaDH-BsNOX片段作为模板,使用由序列号200和86所示的碱基序列构成的DNA作为引物组,进行PCR而得到DNA(以下称为BsAlaDH-BsNOX2)片段。

[0530] 需要说明的是,序列号200所示的碱基序列的5'末端含有与序列号199所示的碱基序列的5'末端互补的序列,序列号86所示的碱基序列的5'末端含有与序列号182所示的碱基序列的5'末端互补的序列。

[0531] 将上述得到的pQE80L-PatA-XylC片段和BsAlaDH-BsNOX2片段用In-Fusion(商标)HD克隆试剂盒(宝生物公司)连接,由此得到表达质粒pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX。用上述得到的表达质粒转化大肠杆菌MG1655 Δ aceE,得到MG1655 Δ aceE/pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX株。

[0532] (2) 使用辅酶再生系统导入株的休止菌体反应

[0533] 使用上述(1)中制作的MG1655/pQE80L-XylC-PatA株、MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XylC-BsNOX株和MG1655 Δ aceE/pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX株,评价基于休止菌体反应的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产率。

[0534] 将各菌株接种到装有2mL含有100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的试管中,在30℃下振荡培养16小时。将该培养液接种到装有40mL含有100mg/L的氨苄青霉素的LB培养基的250mL容量的锥形瓶中,在28℃下振荡培养2小时后,以使终浓度达到1mM的方式添加IPTG,进一步在28℃下振荡培养24小时。其中,仅MG1655 Δ aceE/pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX株的情况下,将到添加IPTG为止的培养时间设为3.5小时。

[0535] 对培养后的该培养液进行离心分离,获得湿菌体。向该湿菌体中以使终浓度达到10mL/L的方式添加二甲苯,在30℃、850rpm条件下进行30分钟的膜处理。

[0536] 制备含有100g/L的上述膜处理后湿菌体、140mM的葡萄糖、50mM的1,4-双(氨甲基)环己烷的顺式体和反式体的混合物(反式比率45.7%)、50mM的氯化镁、10mM的丙酮酸以及10mM的NAD⁺的0.2mL反应液,在30℃、850rpm的条件下反应24小时。

[0537] 反应结束后,通过与实施例1同样的方法对反应生成物和残存底物进行分析。将结

果示于表24。

[0538] [表24]

	微生物	残存底物 (mM)	生成量(mM)	
			TXA	顺式-TXA
[0539]	MG1655/pQE80L-XylC-PatA	24.2	9.9	N.D.
	MG1655/pQE80L-PatA-BsAlaDH-XylC-BsNOX	12.9	21.9	0.8
	MG1655 Δ aceE/pQE80L-PatA-XylC-BsAlaDH-BsNOX	5.3	27.0	1.6

[0540] N.D.:检出限以下(S/N<3)

[0541] 根据表24,由于丙酮酸和NAD⁺的再生基因的导入,4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产量和底物1,4-双(氨甲基)环己烷的消耗量提高。而且,还由于宿主大肠杆菌的丙酮酸分解基因的破坏,目标物生产和底物消耗提高,特别是底物消耗的提高显著。由此推测出,由于丙酮酸分解基因的破坏,促进了底物的氨基转移反应。

[0542] 以上表明了,在基于休止菌体反应的4-(氨甲基)环己烷-1-甲酸的生产中,通过导入使酮酸和辅酶再生的酶的基因或者切断宿主的酮酸分解系统而强化酮酸和辅酶的供给是有效的。

[0543] [实施例11]对反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛具有高特异性的ALDH中的共有氨基酸残基的提取

[0544] 可以说实施例3、实施例4和实施例9中通过使用顺式-反式体混合底物的反应而生成的AMCHA的反式体比率高的ALDH在AMCHA的制造中、特别是TXA的制造中是有用的。为了找到这些ALDH的特征性氨基酸残基,进行了氨基酸序列的比较。

[0545] 提取在实施例3、实施例4和实施例9中通过使用顺式-反式体混合底物的反应而生成的AMCHA的反式体比率为70%以上的ALDH(序列号20、40、41、127、128、130和131),作为对4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的反式体的特异性特别高的ALDH。其结果是,均是被注释为苯甲醛脱氢酶的酶。因此,提取在实施例3、实施例4和实施例9中使用的被注释为苯甲醛脱氢酶的ALDH中的、通过使用顺式-反式体混合底物的反应而生成的AMCHA的反式体比率小于50%的ALDH(序列号134和135),作为不具有对4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的反式体的特异性的ALDH。

[0546] 需要说明的是,为了排除酶活性的强度所带来的影响,排除了实施例3、实施例4和实施例9的通过使用顺式-反式体混合底物的反应而生成的AMCHA小于0.2mM的ALDH。

[0547] 将通过上述操作提取出的ALDH的氨基酸序列用Clustal Omega进行比对(图5A和图5B)。进而,提取在对反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的特异性高的ALDH中保守且在不具有对反式-4-(氨甲基)环己烷-1-甲醛的特异性的ALDH中不保守的氨基酸残基。将提取出的氨基酸残基以对应于XylC(序列号20)的氨基酸残基编号示于表25。

[0548] [表25]

[0549]

对反式-4-(氨基)环己烷-1-甲醛的特异性高的ALDH中保守的氨基酸残基			
G35	A122	D319	P440
A65	L124	D333	C443
L82	V134	Q365	P445
G104	V144	I390	S466
G109	F160	A420	I467
I110	G271	L423	
Q117	A290	V434	

[0550] 启示了表25所示的氨基酸残基对于ALDH具有对反式-4-(氨基)环己烷-1-甲醛的特别高的特异性而言是重要的。

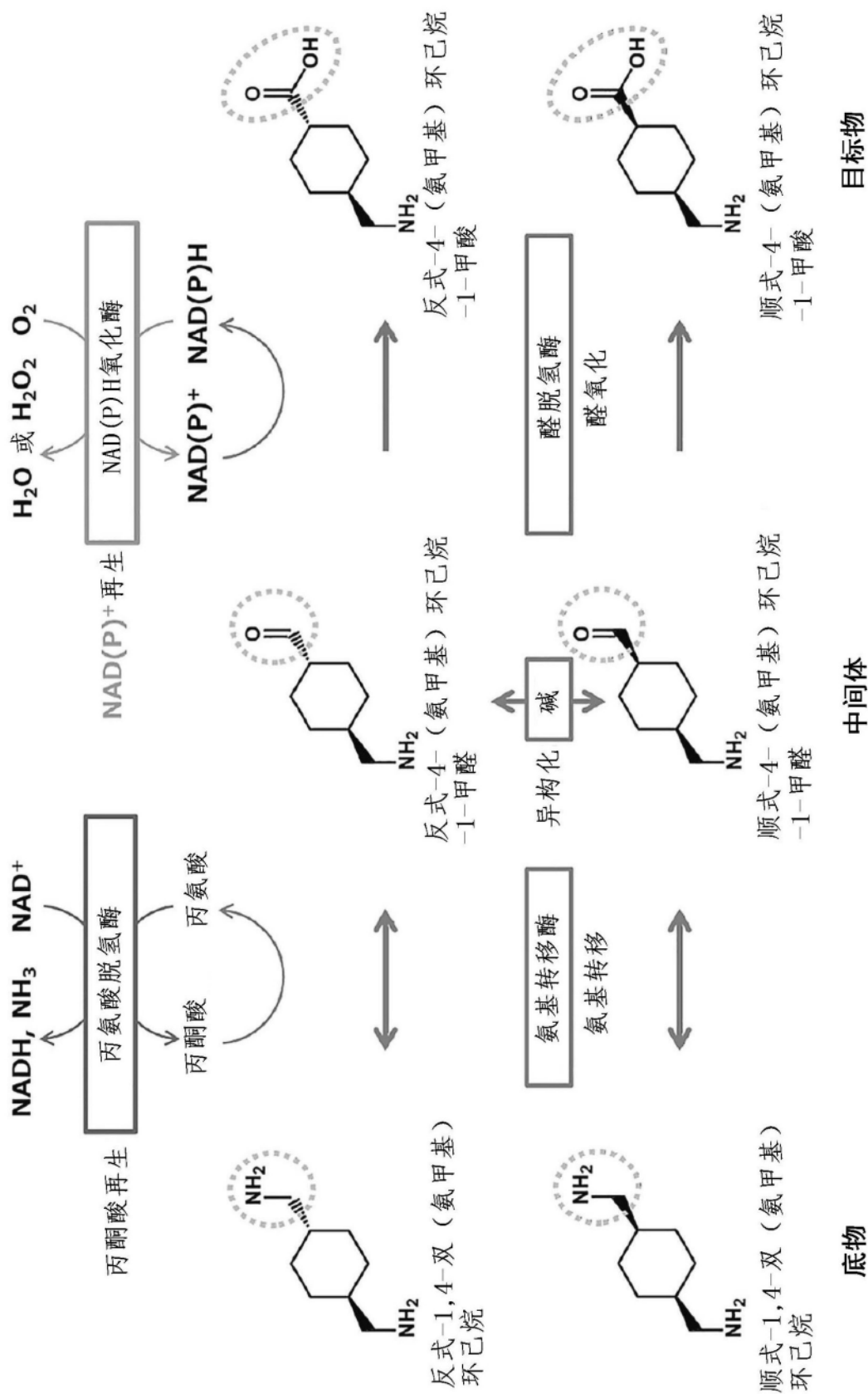


图1

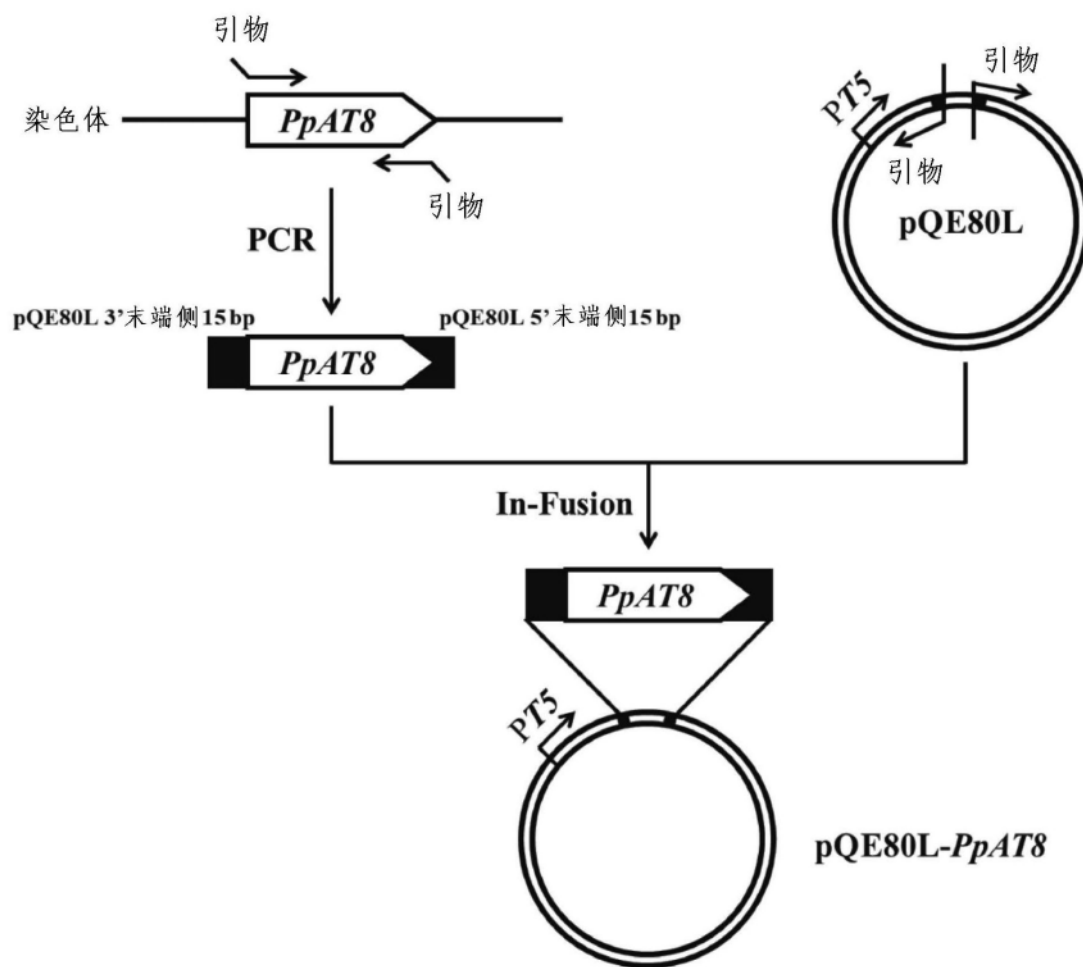


图2

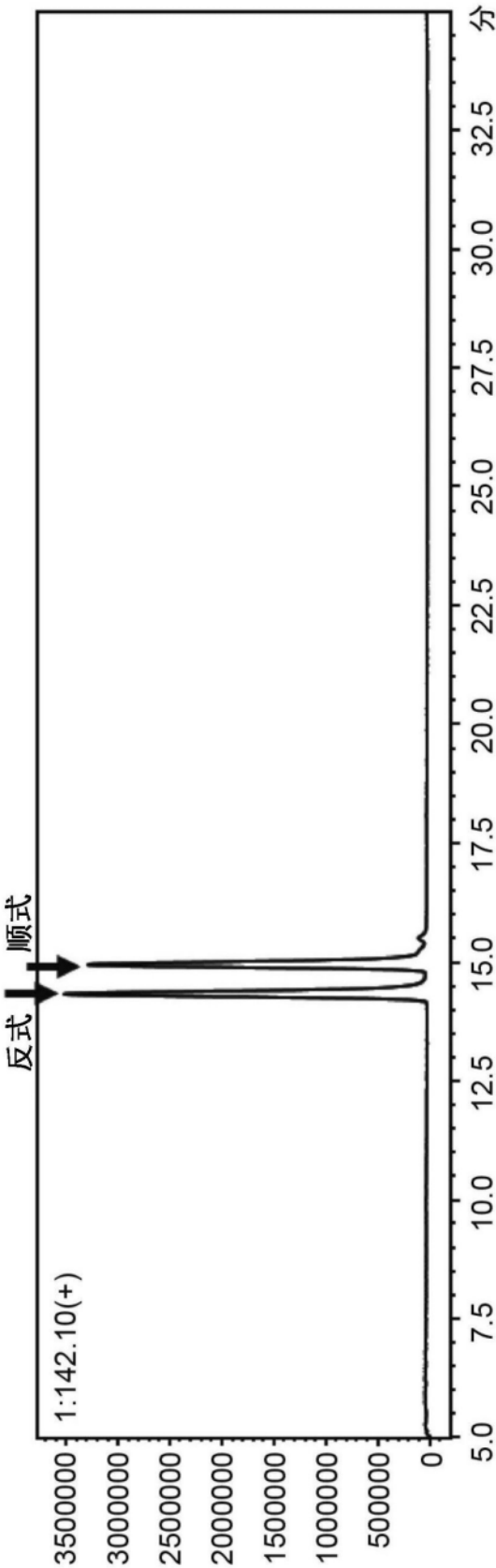


图3

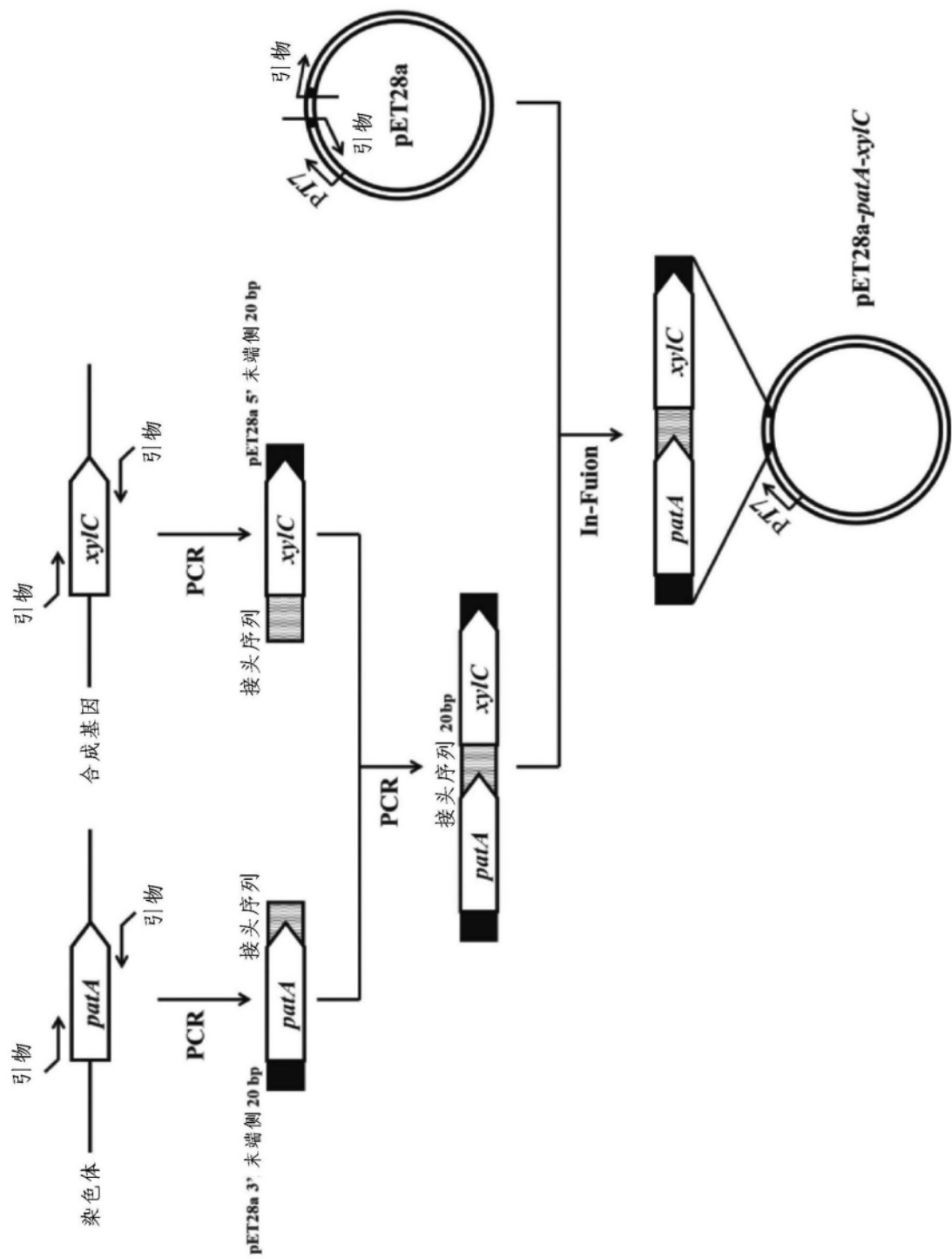


图4

```

20      1 -MRETK-EQPIWYGKVFSSNWVEARGGVANVVDPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKR 58
128      1 -MRETK-EQPIWYGKVFSSNWVEARGGVANVVDPSNGDILGITGVANGEDVDAAVNAAKR 58
40      1 MQQERR-EASIWGKVFSSGWVEARGGVCDVTDPSNGDILGVTGIANGEDVAAAQTAARR 59
130      1 MQQERRKEVPIWYGKVFSSGWVEARGGVASDVTDPSNGDILGVVGIANGEDVAAAQSAARR 60
131      1 MNWNGK--LPIWYGKVFSSNWVVFRRGGVADVDPSSGDVLGVTGIANSEDIATAASAAR 58
41      1 MNTPIK--SNWITGKVFSSGWVAGSAGSGVAEVIIEPATGEVLGQIGIADVKDVAASARS 58
127      1 MNTPVK--TERWSGKIETGSWVPAARGGVAPVLEAATGAALGEVGVASPEDVDAAARSQA 58
134      1 MNTSTV--TNIWDSKIYSGWIAAEGGTAAIIEPATQVLGHIGIGATQDVDRVQIASH 58
135      1 MTGTGS--EGQWTGKIETGSWVAGSAGSGVAEVIIEPATDNQISTIALASREDVDTAIERAVV 58

      *
20      59 AQKEWAAIPFSERAAIVRKAEEKLKEREHFADWNVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQMHQA 118
128      59 AQKEWAAIPFSERAAIVRKAEEKLKEREHFADWNVRECGAIRPKGLWEAGIAYEQMHQA 118
40      60 AQKGWAAIPFSERAEIVRKAEEKLKERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYQMHQA 119
130      61 AQKEWAAIPFSERAEIVRKAEEKLKERENEFADWNVRECGAIRPKGLWEAGITYQMHQA 120
131      59 AQKRWAAAMPFNDRAAILRKAEEKLKEREAFFADWNVRECGAVRMKGVWEAGITYEQMHQA 118
41      59 AQEAWAATPFDCRAAIIITAAEVLRKRAAEFVQWNTRECGSIPPKGEYEVGITYEQMQA 118
127      59 AQRAWAATPFDCRAAIVREARILKERAEEFTQWNVRECGSIVPKGEWEVGIETHEQMQA 118
134      59 AQRSWARMFPDCRANIMREARLVLERAAEFNVWNIRQCGSIPAKAEWELHATCEQILMA 118
135      59 AQRAWAETTEDKRAAVLHEARLIKARAERFNYWNVRECGSIVPKAQWELDASYEQLMA 118

      * *
20      119 AGLAYLSNGTLFPSSAVPGRNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL 178
128      119 AGLAYLSNGTLFPSSAVPGRNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL 178
40      120 ASLAEFLPDGTSEFPSAVAGRLNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLSMRSVAPALVLGNAVIL 179
130      121 ASLAEFLPDGTSLPSTVAGRLNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLAMRSVAPALVLGNAVIL 180
131      119 ASLAEFLPDGTSLFPSSAVPGRNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLAMRSVAPALVLGNAVIL 178
41      119 AALAALPNSGLFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLAMRSVAPALSLGNAVIL 178
127      119 AALAGLPNGMFPSSVPGRNLCQRPVGVGVGVIAPWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL 178
134      119 AALPMQPEGLFPSSMPGRNLSRQLPEIGVITGPWNFPLFLAMRSVAPALALGNAVIL 178
135      119 AALPMHETGTLPSSMPGRNLTWRRLPEIGVGVGVIAPWNFPLFLALRSVAPALALGNAVIL 178

      * *
20      179 KPDLQTAVTGGALIAEIFSDAGMPDGVLHVLPGGADVGESMVANSNGINMISFTGSTQVGR 238
128      179 KPDLQTAVTGGALIAEIFSDAGMPDGVLHVLPGGADVGESMVANSNGINMISFTGSTQVGR 238
40      180 KPDPQTAVTGGALIAEIFSEAGLPDGVLHVLPGGAEEGESMVASFEIDMISFTGSTQVGR 239
130      181 KPDPQTAVTGGALIAEIFSEAGLPDGVLHVLPGGAEEGESMVTNPGIDMISFTGSTQVGR 240
131      179 KPDLQTAVTGGALIAEIFAEAGLPDGVLHVLPGGADAGLAVTNPFIDMISFTGSTAVGR 238
41      179 KPDLQSAVTGGVLIIEIFEEAGLPDGVLHVLPGGAETGEALVRHFDVAMISFTGSTAVGR 238
127      179 KPDLQSAVTGGALIAELFEEDVGLPEGVLCVLPGGPATGDAVVRHFCVNMVSFTGSTAVGR 238
134      179 KPDLQSAVTGGALIAELFEEDAGLPVGVLHVLPGGPATGDAVVKHPEVGMISFTGSTAVGR 238
135      179 KPDLQSAVTGGALIAELFEEDAGLPVGVLHVLPGGAQTGDAVVRHFAVGMISFTGSTAVGR 238

      *
20      239 LIGCKGRMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAAWGTFLHQGVCMAGRHLVHR 298
128      239 LIGCKGRMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAVSCAAWGTFLHQGVCMAGRHLVHR 298
40      240 LIGCKGRMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFLHQGVCMAGRHLVHR 299
130      241 LIGCKGRMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGTFLHQGVCMAGRHLVHR 300
131      239 QIGCKGRMLKKVTELELGNNVHIVLPDADLTGAASCAAWGTFLHQGVCMAGRHLVHR 298
41      239 STAEICGRMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGAASCAAWGSEFLHQGVCMAGRHLVHR 298
127      239 QIGECGRMLKKVALELGNNVHIVLPDADLDGASSCAAWGSEFLHQGVCMAGRHLVHR 298
134      239 AIGQTCGYLLKKVALELGNNVHIVLPDADMDAASSNGAWGAFLHQGVCMQGRHLVHR 298
135      239 QIGETCGRMLKKTSLELGNNVHIVLPDADLDKAASCAAWGAFLHQGVCMQGRHLVHR 298

```

图5A

20	299	DVAQQYAEKLALRAKNLVVGD	PNSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESAC	SAGAKVLAGGT	358
128	299	DVAQQYAEKLALRAKNLVVGD	PNSDRVHLGPLINDKQVVRVHALVESAC	SAGAKVLAGGT	358
40	300	DTACEYAEKLALRAKNLVVGD	PKTDQVHLGPLINDKQVVRVHALVESAC	KAGAKILAGGA	359
130	301	DTACEYAEKLALRAKNLVVGD	PKTDQVHLGPLINDKQVVRVHALVESAC	KAGAKILAGGT	360
131	299	DVAQQYAEKLALRAKNLVVGD	PKTDQVHLGPLINDKQVVRVHALVESAC	KAGAKVLAGGT	358
41	299	SVVDEYAAKLATRAGALHVG	DPNAGPCHLGPLINDKQVVRVHEVVTGSIE	PAGAEVLTGGV	358
127	299	SVADAYAAKLIVERAKKLV	VGDPHAGPAHLGPLINDKQVVRVHRIVTESIA	PAGATILAGGT	358
134	299	SVADQYAEKLALRAAEKLH	VGNPHTDQVHLGPLINDKQVVRVHRIVTESIA	PAGATILAGGT	358
135	299	SVAESYVAKLAARARKLA	VGNPHTEFVHLGPLINDKQVVRVHRIVTESIA	PAGATILAGGT	358
20	359	YQDRYYQATVIMDVKPEME	VFKSEIFGVPVAPITVFD	SIIEAIELANCS	SEYGLAASIHTRA 418
128	359	YQDRYYQATVIMDVKPEME	VFKSEIFGVPVAPITVFD	SIIEAIELANCS	SEYGLAASIHTRA 418
40	360	YQDRYYQATVIMDVTPKMD	VFKLETFGVPVAPITVFD	SVVEEAIELANS	SEYGLAASIHTKS 419
130	361	YQDRYYQATVIMDVTPKMD	DIFELETFGVPVAPITVFD	SVVEEAIELANS	SEYGLAASIHTKD 420
131	359	HQGRFYQPTVLMVDVFPD	MDVFKSEIFGVPVAPITVFD	TIDEAIELANS	SEYGLAASIHTSA 418
41	359	HEGRFYQPTVLMVTKGVT	PEMSAFKSEIFGVPVAPITVFD	TEEAIALSNRSEY	GLAASIHTAS 418
127	359	HEGRFYQPTVLSNVAVD	MPAFEEIFGVPVAPITVFD	TDEEAVALANS	SEYGLAASIHTKS 418
134	359	HERLFYRPTVLTGVT	PDMAAFQEEIFGVPVAPITVFD	HDDDEAVELVNR	SEYGLAASIHTSRN 418
135	359	RRGRFFETVLA	DVTPHMPAFKDEIFGVPVAPITVFD	SVDEAIELVHASEY	GLAASIVHSGS 418
20	419	LATGLDIAKRLNTGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	SGGRFGGPASIDEFTQ	SQWISM 478
128	419	LATGLDIAKRLNTGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	SGGRFGGPASIDEFTQ	SQWISM 478
40	420	LATGLEIARNLKTGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	SGGRFGGPASIDEFTQ	SQWISM 479
130	421	LAAGLEIARNLKTGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	SGGRFGGPASIDEFTQ	SQWISM 480
131	419	IATALQIAKRLKTGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	GTSGRFGGLSSIDEFTQ	SQWISM 478
41	419	AARGIALAKRLKTGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	SGGRFGGPASIDEFTQ	SQWISL 478
127	419	TARALRMASQLKSGMVH	INDQPINCEPHVPFGGMGAS	SGGRFGGPASIDEFTQ	SQWISV 478
134	419	IPRAVALSRLNTGMVH	INDQTVNNEFHVFPFGGMGAS	SGGRFGGPANVHEFTQ	SQWLSI 478
135	419	MSAAMSVARLKS	GMVHINDQTVNNEFHVFPFGGMGAS	SGGRFGGPANVHEFTQ	SQWISA 478
20	479	VEKPANYPF			487
128	479	VEKSASYPF			487
40	480	VEKPSIYPF			488
130	481	VEKPATYPF			489
131	479	VEKPTNYPF			487
41	479	VEKEVIYPF			487
127	479	SEKRAQYPF			487
134	479	MEKEVIYPF			487
135	479	MDAPEIYPF			487

图5B