

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2025-509737
(P2025-509737A)

(43)公表日 令和7年4月11日(2025.4.11)

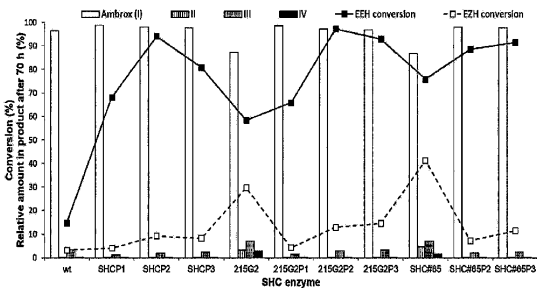
(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 P	7/00 (2006.01)	C 1 2 P	7/00		4 B 0 6 4
C 1 2 N	9/90 (2006.01)	C 1 2 N	9/90	Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N	15/61 (2006.01)	C 1 2 N	15/61		4 C 0 8 3
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15		
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全223頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-555120(P2024-555120)	(71)出願人	501105842		
(86)(22)出願日	令和5年3月17日(2023.3.17)		ジボダン エス エー		
(85)翻訳文提出日	令和6年11月15日(2024.11.15)		スイス国 1 2 1 4 ヴェルニエ、シュ		
(86)国際出願番号	PCT/EP2023/056842		マン ド ラ パルフュムリー 5番		
(87)国際公開番号	WO2023/175123	(74)代理人	110003971		
(87)国際公開日	令和5年9月21日(2023.9.21)		弁理士法人葛和国際特許事務所		
(31)優先権主張番号	22162848.0	(72)発明者	アイヒホルン, エリック		
(32)優先日	令和4年3月17日(2022.3.17)		スイス連邦 8 3 1 0 ケンプタル、ケン		
(33)優先権主張国・地域又は機関			プトパーク 5 0		
	欧州特許庁(EP)	(72)発明者	ハウアー, ベルンハルト		
(31)優先権主張番号	22168607.4		ドイツ連邦共和国 6 7 1 3 6 フェッセ		
(32)優先日	令和4年4月14日(2022.4.14)		ンアイム、メロヴィンガー シュトラーセ		
(33)優先権主張国・地域又は機関			1		
	欧州特許庁(EP)	(72)発明者	シュナイダー, アンドレアス		
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ		ドイツ連邦共和国 7 0 7 7 1 ラインフ		
		最終頁に続く		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 S H C 酵素および酵素バリエント

(57)【要約】

ホモファルネソールから(-)-アンブロックスを、およびビスホモファルネソールからアンブラオキシドを作製するための、スクアレノホペンシクラーゼ(SHC)酵素およびそれらのバリエント、ならびにそれらの使用等。

Fig. 6



【特許請求の範囲】

【請求項1】

(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスが、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列が、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、

10

20

30

40

50

284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する、前記プロセス。

【請求項2】

(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスが、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号1、13、15、23、32と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列が、配列番号1に対し、配列番号1の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する、前記プロセス。

10

【請求項3】

アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスが、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(2,E)-ビスホモファルネソール(ビスEEH)またはビスEEHを含むビスホモファルネソール異性体の混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列が、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、

20

30

40

50

89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する、前記プロセス。

10

20

【請求項4】

アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスが、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(2,E)-ビスホモファルネソール(ビスEEH)またはビスEEHを含むビスホモファルネソール異性体の混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号1、13、15、23、32と少なくともとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列が、配列番号1に対し、配列番号1の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する、前記プロセス。

30

【請求項5】

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWが、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAが、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

40

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGが、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる、請求項1～4のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項6】

50

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWが、Gによって置き換えられる、請求項1～5のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項7】

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWが、Gによって置き換えられ、および

10

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAが、Vによって置き換えられる、請求項1～6のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項8】

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWが、Gによって置き換えられ、および

20

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGが、Mによって置き換えられる、請求項1～7のいずれか一項に記載のプロセス。

30

【請求項9】

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWが、Gによって置き換えられ、

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAが、Vによって置き換えられ、および

40

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGが、Mによって置き換えられる、請求項1～8のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項10】

配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、

50

54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、
373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55
、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、7
2、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、
89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、10
4、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、1
17、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、
130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142
、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、15
5、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、1
68、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、
181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193
、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、20
6、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、2
19、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、
232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244
、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、25
7、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、2
70、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、
283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295
、296、307、308、309、もしくは310の位置168でのアミノ酸がSであるか、また
は配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、2
5、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、
54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、
373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55
、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、7
2、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、
89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、10
4、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、1
17、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、
130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142
、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、15
5、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、1
68、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、
181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193
、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、20
6、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、2
19、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、
232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244
、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、25
7、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、2
70、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、
283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295
、296、307、308、309、もしくは310の168に対応する野生型SHCのアミノ酸配列
の位置でのアミノ酸がSである、請求項1～9のいずれか一項に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

【請求項11】

- SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号7、8、9、または386と少なくとも70.0%

の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、ならびに以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号10、11、12、または387と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:M132R、A224V、I432Tを有し、ならびに以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する、請求項1~10のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項12】

位置169でのWが、Gによって置き換えられる、請求項1~11のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項13】

位置169でのWが、Gによって置き換えられ、かつ位置でのAが、Vによって置き換えられる、請求項1~11のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項14】

位置169でのWが、Gによって置き換えられ、かつ位置600でのGが、Mによって置き換えられる、請求項1~11のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項15】

位置169でのWが、Gによって置き換えられ、位置306でのAが、Vによって置き換えられ、かつ位置600でのGが、Mによって置き換えられる、請求項1~11のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項16】

- SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号23、304、359、もしくは360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W172G、A311V、およびG609Mの少なくとも1つを有し(Tel SHC/HACバリエーション)、または

- SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号32、311、357、もしくは358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W196G、A335V、およびG629Mを有し(Sco SHC/HACバリエーション)、または

- SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号13、312、353、もしくは354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W222G、A368V、およびG667Mの少なくとも1つを有し(Zmo SHC1バリエーション)、または

- SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号15、313、355、もしくは356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W177G、A321V、およびG619Mの少なくとも1つを有する(Zmo SHC2バリエーション)、請求項1~15のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項17】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172G突然変異を有する、請求項1~16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項18】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172GおよびA311Vの突然変異を有する、請求項1~16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項19】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172GおよびG609Mの突然変異を有する、請求項1~16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項20】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172G、A311V、およびG609Mの突然変異を有する、請求項1~16のいずれか一項に記載のプロセス。

10

20

30

40

50

【請求項 2 1】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196G突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 2】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196GおよびA335Vの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 3】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196GおよびG629Mの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

10

【請求項 2 4】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196G、A335V、およびG629Mの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 5】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222G突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

20

【請求項 2 6】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222GおよびA368Vの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 7】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222GおよびG667Mの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 2 8】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222G、A321V、およびG667Mの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

30

【請求項 2 9】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177G突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 0】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177GおよびA321Vの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

40

【請求項 3 1】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177GおよびG619Mの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 2】

SHC/HAC酵素バリエーションが、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177G、A321V、およびG619Mの突然変異を有する、請求項1～16のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 3 3】

SHC/AHC酵素バリエーションが、配列番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、305、3

50

06、304、302、311、312、313、353、354、355、356、357、358、359、360、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、352、385、もしくは386を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなるアミノ酸配列を有する、請求項1～32のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項34】

本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションが、次を呈する：

参照SHC酵素(例として、野生型SHC、たとえば配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるもの、または215G2 AacSHC、またはSHC#65、またはそのバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば配列番号2、3、47～48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383)と比較して、

- EEHに対する(またはビスEEHに対する)、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- (-)-アンブロックス(またはアンブラオキシド)に対する、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 基質の具体的な異性体に対する、ホモファルネソールまたはビス-ホモファルネソール以外の基質が使用されるとき(例として、エチル-ホモファルネソール、ヒドロキシファルネシルアセトン等 - 例えば夫々W02021/110858およびW02021/209482を見よ)に増大される特異性、
- 増大される産生能、および/または
- 反応の最初の3～6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、EEH(またはBisEEH)の変換の増大された程度、ならびにEEH(またはビスEEH)の増大された変換率、請求項1～33のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項35】

請求項1～34のいずれか一項に定義されるとおりの、SHC/HAC酵素バリエーション。

【請求項36】

酵素的変換が、約30℃～約50℃(例えば、約40℃から約50℃まで)の範囲にある温度にて、および/または約5～約6の範囲にあるpHにて起こる、請求項1～34のいずれか一

10

20

30

40

50

項に記載のプロセス。

【請求項 37】

プロセスが、SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞を培養することを含む、請求項35を除く請求項請求項1～36のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 38】

組換え宿主細胞が、配列番号38、39、40、41、42、43、44、45、または46から選択される核酸配列を含む、請求項35に記載のプロセス。

【請求項 39】

請求項35を除く請求項1～38のいずれか一項に記載のプロセスであって、ここでEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物が、EE:EZ異性体混合物であり、好ましくはE E:EZ異性体混合物は、80:20の重量比率にある、前記プロセス。

10

【請求項 40】

SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、または80:20の重量比率にあるEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率が、約2:1、1:1、または約0.5:1、または約0.1:1である、請求項35を除く請求項1～39のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 41】

SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:E Z異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率が、0.1～0.5の範囲、好ましくは0.4であり、かつEEHの濃度が、250g/l～650g/lの範囲、好ましくは450g/lである、請求項35を除く請求項1～40のいずれか一項に記載のプロセス。

20

【請求項 42】

SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:E Z異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率が、1であり、かつEEHの濃度が、250g/lである、請求項35を除く請求項1～41のいずれか一項に記載のプロセス。

【請求項 43】

請求項35を除く請求項1～42のいずれか一項に記載のプロセスによって得られるかまたは得ることができる、アモルファス形態または結晶形態の固体形態にある(-)-アンブロックス。

30

【請求項 44】

布の仕上げ剤、洗面用具、美容用品、洗浄製品、洗剤製品、および/または石鹸製品などの、フレグランスあるいは化粧料あるいは消費者向製品の一部としての、請求項43に記載の(-)-アンブロックスの使用。

【請求項 45】

請求項43に記載の(-)-アンブロックスを含む、フレグランスまたは化粧料または消費者向製品。

【請求項 46】

請求項35に記載のSHC/HAC酵素バリエーションをコードする、核酸配列。

40

【請求項 47】

請求項46に記載の核酸配列を含む、構築物。

【請求項 48】

請求項46に記載の核酸配列または請求項47に記載の構築物を含む、組換え宿主細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本発明は一般に、SHC/HAC酵素およびそれらのバリエーションに関する。本発明はさらに、SHC/HAC酵素およびそれらのバリエーションの、例えば、(3E,7E)-ホモファルネソール(

50

EEH)を(-)-アンブロックス(Ambrox)へ酵素的に変換するため、またはE,E-ビスホモファルネソール(ビスEEH)をアンブラオキシド(Ambra oxide)へ酵素的に変換するため等の、様々な使用に関する。本発明はまた、酵素反応の産物、例えば、SHC/HAC酵素およびそれらのバリエーションを使用して作製された(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシド、および該産物の様々な使用にも関する。

【背景技術】

【0002】

背景

スクアレンホペンシクラーゼ(Squalene Hopene Cyclase)(SHC)は、線状トリテルペノイドスクアレンのホペンおよびホパノールへの環化のための生体触媒として作用する膜結合酵素である。

【0003】

様々な細菌からの数多の野生型およびバリエーションのSHC酵素は、(3E,7E)-ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するのに有用であることが実証されている(例えば、WO 2016/170099;WO 2018/157021;Neumann & Simon 1986,Biol Chem Hoppe-Seyler 367,723-729;JP2009060799;Seckler & Poralla 1986,Biochem Biophys Act 356-363;Ochs et al 1990,J Bacteriol 174,298-302;WO 2010/139719;US 8759043;WO 2012/066059;Seitz et al 2012,J Molecular Catalysis B:Enzymatic 84,72-77;およびSeitz 2012 PhD thesis(<http://elib.uni-stuttgart.de/handle/11682/1400>)を見よ、これらの内容は参照により本明細書に組み込まれる)。(-)-アンブロックスを、例えば新しいSHC酵素または酵素バリエーションを使用して、作製するための新しくかつ改善された方法を提供することが所望される。また、他の基質を環化して、例えばフレグランスにおいてまたはフレグランスとして有用な化合物を形成するための、新しくかつ改善された方法を提供することも所望される。

【発明の概要】

【0004】

概要

第1の側面において、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスが提供されるが、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274

、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する。

10

20

30

40

50

【0005】

態様において、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスが提供されるが、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、13、15、23、32と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1に対し、配列番号1の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する。

【0006】

態様において、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスが提供されるが、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(2,E)-ビスホモファルネソール(ビスEEH)またはビスEEHを含むビスホモファルネソール異性体の混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61

、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する。

【0007】

態様において、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスが提供されるが、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(2,E)-ビ

10

20

30

40

50

スホモファルネソール(ビスEEH)またはビスEEHを含むビスホモファルネソール異性体の混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、13、15、23、32と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1に対し、配列番号1の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有する。

【0008】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、
- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または
- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる。

【0009】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられる。

【0010】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および
- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vによって置き換えられる。

【0011】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、

54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0012】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられ、

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vによって置き換えられ、および

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0013】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310の位置168でのアミノ酸がSであるか、あるいは

配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310の168に対応する野生型SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸がSである。

10

20

30

40

50

【0014】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここで配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置168でのアミノ酸は、Sである(または配列番号1の168に対応する野生型SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸は、Sである)。

【0015】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここで:

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号7、8、9、または386と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、ならびに以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号10、11、12、または385と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:M132R、A224V、I432Tを有し、ならびに以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する。

【0016】

態様において、位置169でのWがGによって置き換えられるプロセスが提供される。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および位置169でのAは、Vによって置き換えられる。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および位置600でのGは、Mによって置き

換えられる。

【0017】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

位置169でのWは、Gによって置き換えられ、位置306でのAは、Vによって置き換えられ、および位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0018】

態様において、上に定義されるとおりのプロセスが提供されるが、ここで:

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W172G、A311V、およびG609Mの少なくとも1つを有し(Tel SHC/HACバリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W196G、A335V、およびG629Mを有し(Sco SHC/HACバリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W222G、A368V、およびG667Mの少なくとも1つを有し(Zmo SHC1バリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W177G、A321V、およびG619Mの少なくとも1つを有する(Zmo SHC2バリエーション)。

【0019】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172G突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172GおよびA311Vの突然変異を有する。

【0020】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172GおよびG609Mの突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW172G、A311V、およびG609Mの突然変異を有する。

【0021】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196G突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196GおよびA335Vの突然変異を有する。

【0022】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196GおよびG629Mの突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW196G、A335V、およびG629Mの突然変異を有する。

【0023】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222G突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222GおよびA368Vの突然変異を有する。

10

【0024】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222GおよびG667Mの突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW222G、A368V、およびG667Mの突然変異を有する。

20

【0025】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177G突然変異を有する。

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177GおよびA321Vの突然変異を有する。

【0026】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177GおよびG619Mの突然変異を有する。

30

態様において、プロセスが提供されるが、ここで:

SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW177G、A321V、およびG619Mの突然変異を有する。

【0027】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここで、SHC/AHC酵素バリエーションは、配列番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、305、306、304、302、311、312、313、353、354、355、356、357、358、359、360、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、もしくは352を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなるアミノ酸配列を有する。

40

【0028】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここで本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションは次を呈する:

参照SHC酵素(例として、野生型SHC、たとえば配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、3

50

4、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるもの、215G2 AacSHCもしくはSHC#65、またはバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるもの)と比較して、

- EEHに対する(またはビスEEHに対する)、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- (-)-アンブロックス(またはアンブラオキシド)に対する、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 基質の具体的な異性体に対する、ホモファルネソールまたはビス-ホモファルネソール以外の基質が使用されるとき(例として、エチル-ホモファルネソール、ヒドロキシファルネシルアセトン等 - 例えば夫々W02021/110858およびW02021/209482を見よ)に増大される特異性、
- 増大される産生能、および/または
- 反応の最初の3~6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、EEH(もしくはビスEEH)の増大された変換度、ならびにEEH(またはビスEEH)の増大された変換率。

【0029】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここで酵素的変換は、約30℃~約50℃の範囲、例えば約40℃から約50℃までの温度にて、および/または約5~約6の範囲のpHにて起こる。

【0030】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここでプロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞を培養することを含む。

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここで組換え宿主細胞は、配列番号38、39、40、41、42、43、44、45、または46から選択される核酸配列を含む。

【0031】

態様において、上に定義されたとおりのプロセスが提供されるが、ここでEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物は、EE:EZ異性体混合物であり、好ましくはEE:EZ異性体混合物は、80:20の重量比率にある。

【0032】

態様において、上に定義されるとおりのプロセスが提供されるが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、または80:20の重量比率にあるEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、約2:1、1:1、または約0.5:1、または約0.1:1である。

【0033】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで：SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、0.4であり、かつEEHの濃度は、450 g/lである。

【0034】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで：SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、1であり、かつEEHの濃度は、250 g/lである。

【0035】

態様において、プロセスが提供されるが、ここで：SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、1であり、かつEEHの濃度は、300 g/lである。

【0036】

さらなる側面において、本明細書に定義されるとおりのSHC/HAC酵素バリエーションが提供される。

さらなる側面において、本明細書に定義されるとおりのプロセスによって得られるか、もしくはそれによって得ることができる、アモルファス形態または結晶形態の固体形態にある(-)-アンブロックスが提供される。

【0037】

さらなる側面において、本明細書において得られるとおりの(-)-アンブロックスの、フレグランス製品または化粧用製品または消費者向製品、たとえば、布地ケア、洗面用具、美容用品、洗浄製品、洗剤製品、および/または石鹸製品の一部としての使用が提供される。

【0038】

さらなる側面において、本明細書において得られるとおりの(-)-アンブロックスを含むフレグランスまたは化粧品または消費者向製品が提供される。

さらなる側面において、本明細書に定義されるとおりのSHC/HAC酵素バリエーションをコードする核酸配列が提供される。

【0039】

さらなる側面において、本明細書に定義されるとおりの核酸配列を含む構築物が提供される。

さらなる側面において、本明細書に定義されるとおりの核酸配列または構築物を含む組換え宿主細胞が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0040】

図の簡単な記載

【図1】図1:AacSHCと215G2SHC P1、P2、およびP3バリエーションとでのEEH変換。反応は、8 g/l EEH(AacSHC wt 4 g/l EEHのみ)、OD_{650nm}が10までの細胞で、個々に最適化された反応条件(T、pH、SDS)を適用して行った。

【0041】

【図2】図2は、E,E-およびE,Z-ホモファルネソール異性体の混合物を使用する、ホモファルネソールのSHC触媒による環化の反応産物を示す。

【0042】

10

20

30

40

50

【図3】図3:P1、P2、およびP3 SHCバリエーションでの基質特異性および産物選択性。反応は、8 g/l EEH、OD_{650nm}が10までの細胞で、個々に最適化された反応条件(T、pH、SDS)を適用して行った。

【0043】

【図4】図4:SHCバリエーションでのホモファルネソールの環化。反応は、125 g/l EEHおよび250 g/l細胞で、バリエーションの各々に最適と定義されたT、pH、およびSDS(SDS:細胞比率)の条件にて行った。

【0044】

【図5】図5:SHCバリエーションでのホモファルネソールの生物変換。反応は、125 g/l EEHおよび250 g/l細胞で、バリエーションの各々に最適と定義されたT、pH、およびSDS(SDS:細胞比率)の条件にて行った。

10

【0045】

【図6】図6:SHC酵素バリエーションでのホモファルネソールの生物変換における基質特異性および産物選択性。反応は、125 g/l E,Z-ホモファルネソールおよび250 g/l細胞で、SHC酵素の各々に最適と定義されたT、pH、およびSDS(SDS:細胞比率)の条件にて行った。

【0046】

【図7】図7:SHCバリエーションでのホモファルネソールの生物変換。反応は、250 g/l EEHおよび250 g/l細胞で、バリエーションの各々に最適と定義されたT、pH、およびSDS(SDS:細胞比率)の条件にて行った。

20

【0047】

【図8】図8:SHCバリエーションでのホモファルネソールの生物変換。反応は、A:250 g/l EEHおよびSHC#65 P2で、ならびにB:300 g/l EEHおよびSHC#65で、さまざまな[EEH]:[細胞]比率にて、ならびにバリエーションの各々に最適と定義されたT、pH、およびSDS(SDS:細胞比率)の条件にて、行った。

【0048】

【図9-1】図9:スクアレノペンシクラゼのアミノ酸配列のアラインメント。図は、CLUSTAL O(1.2.4)で調製された表3および/または表16に列挙されているスクアレノペンシクラゼ酵素のアミノ酸配列アラインメントを示す。Alicyclobacillus acidocaldarius(AacSHC)配列の位置169、306、および600でのアミノ酸は、黒色背景上に白色で強調されている。位置169でのWは、位置600でのGと同様に、アラインされたアミノ酸配列を通してほぼ厳重に(16配列のうち15配列に)保存されており、1つの単一保存的置換である。位置306でのAは、あまり保存されていない(16配列のうち9配列)。

30

【図9-2】図9:スクアレノペンシクラゼのアミノ酸配列のアラインメント。図は、CLUSTAL O(1.2.4)で調製された表3および/または表16に列挙されているスクアレノペンシクラゼ酵素のアミノ酸配列アラインメントを示す。Alicyclobacillus acidocaldarius(AacSHC)配列の位置169、306、および600でのアミノ酸は、黒色背景上に白色で強調されている。位置169でのWは、位置600でのGと同様に、アラインされたアミノ酸配列を通してほぼ厳重に(16配列のうち15配列に)保存されており、1つの単一保存的置換である。位置306でのAは、あまり保存されていない(16配列のうち9配列)。

40

【図9-3】図9:スクアレノペンシクラゼのアミノ酸配列のアラインメント。図は、CLUSTAL O(1.2.4)で調製された表3および/または表16に列挙されているスクアレノペンシクラゼ酵素のアミノ酸配列アラインメントを示す。Alicyclobacillus acidocaldarius(AacSHC)配列の位置169、306、および600でのアミノ酸は、黒色背景上に白色で強調されている。位置169でのWは、位置600でのGと同様に、アラインされたアミノ酸配列を通してほぼ厳重に(16配列のうち15配列に)保存されており、1つの単一保存的置換である。位置306でのAは、あまり保存されていない(16配列のうち9配列)。

50

【図 9-4】 図9:スクアレノホペンシクラーゼのアミノ酸配列のアラインメント。図は、CLUSTAL O(1.2.4)で調製された表3および/または表16に列挙されているスクアレノホペンシクラーゼ酵素のアミノ酸配列アラインメントを示す。Alicyclobacillus acidocaldarius(AacSHC)配列の位置169、306、および600でのアミノ酸は、黒色背景上に白色で強調されている。位置169でのWは、位置600でのGと同様に、アラインされたアミノ酸配列を通してほぼ厳重に(16配列のうち15配列に)保存されており、1つの単一保存的置換である。位置306でのAは、あまり保存されていない(16配列のうち9配列)。

【0049】

【図 10】 図10:SHCバリエーションでのビス-ホモファルネソールの環化。反応は、4g/l E, E-ビス-ホモファルネソールおよびOD_{650nm}が10までの細胞で、T、pH、およびSDS濃度に関してSHC#65およびSHC#65 P2に最適と個々に定義された条件を適用して行った。

【0050】

【図 11】 図11:野生型およびバリエーションのSHC酵素でのホモファルネソールの環化。反応は、脱イオン水中30℃にて、2.36g/lホモファルネソールおよびOD_{650nm}が6までの細胞で行った。

【0051】

【図 12】 図12:SHC#65 P2でのホモファルネソールの生物変換。反応は、400g/l EEHと、SHC#65 P2を産生している細胞とで、0.6、0.5、0.4、および0.3の[細胞]:[EEH]比率にて行った。反応は、35℃、pH5.8にて、および0.025の一定[SDS]:[細胞]比率にて行った。

【0052】

【図 13】 図13:SHC#65 P2でのホモファルネソールの生物変換。反応は、450g/l EEHおよび180g/l細胞(0.4の[細胞]:[EEH]比率)、または250g/l EEHおよび250g/l細胞(1.0の[細胞]:[EEH]比率)で、35℃、pH5.8にて、および0.030の一定[SDS]:[細胞]比率にて行った。

【発明を実施するための形態】

【0053】

配列の概要

配列番号1は、野生型Alicyclobacillus acidocaldarius(Aac)SHCアミノ酸配列である。

配列番号2は、置換M132R、A224V、I432T、A557T、およびR613Sをもつ配列番号1に対応し、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#65またはSHC#65バリエーションと称されることもある。

【0054】

配列番号3は、215G2 SHC(または215G2 SHCバリエーション)と称されることもあり、突然変異M132R、A224V、およびI432Tをもつ野生型AacSHCアミノ酸配列に対応する。

配列番号4は、置換W169Gをもつ配列番号1に対応する(またAac SHC P1とも呼ばれる)。

【0055】

配列番号5は、置換W169GおよびG600Mをもつ配列番号1に対応する(またAac SHC P2とも呼ばれる)。

配列番号6は、置換W169G、A306V、およびG600Mをもつ配列番号1に対応する(またAac SHC P3とも呼ばれる)。

【0056】

配列番号7は、置換W169Gをもつ配列番号2に対応する(またSHC#65 P1バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号8は、置換W169GおよびG600Mをもつ配列番号2に対応する(またSHC#65

10

20

30

40

50

P2バリエーションとも呼ばれる)。

【0057】

配列番号9は、置換W169G、A306V、およびG600Mをもつ配列番号2に対応する(またSHC#65 P3バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号10は、置換W169Gをもつ配列番号3に対応する(また215G2 SHC P1バリエーションとも呼ばれる)。

【0058】

配列番号11は、置換W169GおよびG600Mをもつ配列番号3に対応する(また215G2 SHC P2バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号12は、置換W169G、A306V、およびG600Mをもつ配列番号3に対応する(また215G2 SHC P3バリエーションとも呼ばれる)。

【0059】

配列番号13～配列番号34、配列番号384は、本発明において配列番号1として使用されてもよい野生型SHC酵素である(また表3および16も見よ)。配列番号13は、配列番号384と同一である。

配列番号35は、野生型AacSHCをコードするヌクレオチド配列である。

【0060】

配列番号36は、配列番号2(SHC#65バリエーション)のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号37は、215G2バリエーション(配列番号3)をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号38は、配列番号4によって表されるAacSHC P1をコードするヌクレオチド配列である。

【0061】

配列番号39は、配列番号5によって表されるAacSHC P2をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号40は、配列番号6によって表されるAacSHC P3をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号41は、配列番号7によって表されるSHC#65 P1バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

【0062】

配列番号42は、配列番号8によって表されるSHC#65 P2バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号43は、配列番号9によって表されるSHC#65 P3バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

【0063】

配列番号44は、配列番号10によって表される215G2 P1バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号45は、配列番号11によって表される215G2 P2バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

【0064】

配列番号46は、配列番号12によって表される215G2 P3バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

配列番号47は、置換M132R、A224V、I432T、Y81H、A557T、およびR613Sをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#66と称されることもある。

【0065】

配列番号48は、置換M132R、A224V、I432T、Y81H、H431L、およびA557Tをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#110B8と称されることもある。

配列番号49は、置換M132R、A224V、I432T、T90A、およびR613Sをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#90C7と称されることもある。

【0066】

配列番号50は、置換M132R、A224V、I432T、A172T、およびM277Kをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#115A7と称されることもある。

配列番号51は、追加の突然変異L37QをもつSHC/HACバリエーション215G2 SHC(配列番号3によって表される)のアミノ酸配列である。

【0067】

配列番号52は、追加の突然変異V174IをもつSHC/HACバリエーション215G2 SHC(配列番号3によって表される)のアミノ酸配列である。

配列番号53は、追加の突然変異V174IおよびF601YをもつSHC/HACバリエーション215G2 SHC(配列番号3によって表される)のアミノ酸配列である。

【0068】

配列番号54は、追加の突然変異L37Q、V174I、およびF601YをもつSHC/HACバリエーション215G2 SHC(配列番号3によって表される)のアミノ酸配列である。

配列番号55~296、307~310は、表2または16において同定されるとおりのSHC/HACの野生型アミノ酸配列である。

【0069】

配列番号297~300は、配列番号47~50をコードするヌクレオチド配列である。

配列番号301は、V45L、Q54E、M184I、T326S、F624YをもつGmoSHCバリエーションのアミノ酸配列である。

配列番号302は、W172G、P311V、F425Y、G609Aの突然変異をもつTelSHCのアミノ酸配列である。

【0070】

配列番号303は、Q221S、W222G、A368V、F486Y、G667Aの突然変異をもつZmoSHC1のアミノ酸配列である。

配列番号304は、W172G突然変異(P1)をもつTelSHCのアミノ酸配列である。

【0071】

配列番号305は、W169G、G600M、M132R、A224V、およびI432Tの突然変異をもつAacSHCのアミノ酸配列である。

配列番号306は、W169G、G600M、M132R、およびI432Tの突然変異をもつAacSHCのアミノ酸配列である。

【0072】

配列番号307~310は(配列番号55~296と一緒に)、表2または16において同定されるとおりのSHC/HACの野生型アミノ酸配列である。

配列番号311は、W196G突然変異(P1)をもつScoSHC1のアミノ酸配列である。

【0073】

配列番号312は、W222G突然変異(P1)をもつZmoSHC1のアミノ酸配列である。

配列番号313は、W177G突然変異(P1)をもつZmoSHC2のアミノ酸配列である。

配列番号314は、SHC/HACに見出されるモチーフDXDDTAである。

【0074】

配列番号315~360は、SHCバリエーションのアミノ酸配列であり、とくに配列番号315~347、348、350~352(349を除く)は、AacSHC(配列番号1)に由来するSHCバリエーションである。

【0075】

配列番号315は、置換W169Gをもつ配列番号1に対応する。

配列番号316は、置換W169Aをもつ配列番号1に対応する。

配列番号317は、置換W169Vをもつ配列番号1に対応する。

10

20

30

40

50

配列番号318は、置換W169GおよびG600Aをもつ配列番号1に対応する。

配列番号319は、置換W169GおよびG600Vをもつ配列番号1に対応する。

【0076】

配列番号320は、置換W169GおよびG600Lをもつ配列番号1に対応する。

配列番号321は、置換W169GおよびG600Iをもつ配列番号1に対応する。

配列番号322は、置換W169GおよびG600Mをもつ配列番号1に対応する。

配列番号323は、置換W169AおよびG600Aをもつ配列番号1に対応する。

配列番号324は、置換W169AおよびG600Vをもつ配列番号1に対応する。

【0077】

配列番号325は、置換W169AおよびG600Lをもつ配列番号1に対応する。

配列番号326は、置換W169AおよびG600Iをもつ配列番号1に対応する。

配列番号327は、置換W169AおよびG600Mをもつ配列番号1に対応する。

配列番号328は、置換W169VおよびG600Aをもつ配列番号1に対応する。

配列番号329は、置換W169VおよびG600Vをもつ配列番号1に対応する。

【0078】

配列番号330は、置換W169VおよびG600Lをもつ配列番号1に対応する。

配列番号331は、置換W169VおよびG600Iをもつ配列番号1に対応する。

配列番号332は、置換W169VおよびG600Mをもつ配列番号1に対応する。

配列番号333は、置換W169G、G600A、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号334は、置換W169G、G600V、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

【0079】

配列番号335は、置換W169G、G600L、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号336は、置換W169G、G600I、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号337は、置換W169G、G600M、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号338は、置換W169A、G600A、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号339は、置換W169A、G600V、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

【0080】

配列番号340は、置換W169A、G600L、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号341は、置換W169A、G600I、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号342は、置換W169A、G600M、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号343は、置換W169V、G600A、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号344は、置換W169V、G600V、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

【0081】

配列番号345は、置換W169V、G600L、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する

。

配列番号346は、置換W169V、G600I、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号347は、置換W169V、G600I、およびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号348は、置換M132R、A224V、およびI432Tをもつ配列番号1に対応する。

配列番号349は、AacSHCに由来するSHCバリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

10

20

30

40

50

【0082】

配列番号350は、置換W169GおよびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号351は、置換W169AおよびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号352は、置換W169VおよびA306Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号353は、置換W222GおよびG667Mをもつ配列番号13に対応する(またZmoSHC1 P2バリエーションとも呼ばれる)。

【0083】

配列番号354は、置換W222G、A368V、およびG667Mをもつ配列番号13に対応する(またZmoSHC1 P3バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号355は、置換W177GおよびG619Mをもつ配列番号15に対応する(またZmoSHC2 P2バリエーションとも呼ばれる)。

【0084】

配列番号356は、置換W177G、A321V、およびG619Mをもつ配列番号15に対応する(またZmoSHC2 P3バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号357は、置換W196GおよびG629Mをもつ配列番号32に対応する(またScoSHC P2バリエーションとも呼ばれる)。

【0085】

配列番号358は、置換W196G、A335V、およびG629Mをもつ配列番号32に対応する(またSScoSHC P3バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号359は、置換W172GおよびG609Mをもつ配列番号23に対応する(またTelSHC P2バリエーションとも呼ばれる)。

【0086】

配列番号360は、置換W172G、A311V、およびG609Mをもつ配列番号23に対応する(またTelSHC P3バリエーションとも呼ばれる)。

配列番号361～383は、表18において同定されるとおりのAacSHC(配列番号1)に由来するSHCバリエーションのアミノ酸配列である。

【0087】

配列番号361は、置換T77Aをもつ配列番号1に対応する。

配列番号362は、置換I92Vをもつ配列番号1に対応する。

配列番号363は、置換F129Lをもつ配列番号1に対応する。

配列番号364は、置換M132Rをもつ配列番号1に対応する。

配列番号365は、置換A224Vをもつ配列番号1に対応する。

【0088】

配列番号366は、置換I432Tをもつ配列番号1に対応する。

配列番号367は、置換Q579Hをもつ配列番号1に対応する。

配列番号368は、置換F601Yをもつ配列番号1に対応する。

配列番号369は、置換M132RおよびI432Tをもつ配列番号1に対応する。

配列番号370は、置換F601Yをもつ配列番号1に対応する。

【0089】

配列番号371は、置換T77A、I92V、およびF129Lをもつ配列番号1に対応する。

配列番号372は、置換Q579HおよびF601Yをもつ配列番号1に対応する。

配列番号373は、置換F129Lをもつ配列番号1に対応する。

配列番号374は、置換F129LおよびF601Yをもつ配列番号1に対応する。

配列番号375は、置換F129L、M132R、およびI432Tをもつ配列番号1に対応する。

【0090】

配列番号376は、置換M132R、I432T、およびF601Yをもつ配列番号1に対応する。

配列番号377は、置換F129L、M132R、I432T、およびF601Yをもつ配列番号1に対応する。

配列番号378は、置換F605Wをもつ配列番号1に対応する。

配列番号379は、置換M132R、A224V、I432T、A557T、およびH431Lをもつ配

10

20

30

40

50

列番号1に対応し、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#49またはSHC#49バリエーションと称されることもある。

【0091】

配列番号380は、置換M132R、A224V、I432T、Y81H、A557T、およびR613Sをもつ配列番号1に対応し、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#66またはSHC#66バリエーションと称されることもある。

配列番号381は、置換M132R、A224V、I432T、Y81H、H431L、およびA557Tをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#110B8またはSHC#110B8バリエーションと称されることもある。

【0092】

配列番号382は、置換M132R、A224V、I432T、T90A、およびR613Sをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#90C7またはSHC#90C7バリエーションと称されることもある。

配列番号383は、置換M132R、A224V、I432T、A172T、およびM277Kをもつ配列番号1に対応しており、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#115A7またはSHC#115A7バリエーションと称されることもある。

【0093】

配列番号385は、置換W169GおよびA306Vをもつ配列番号3に対応する。

配列番号386は、置換W169GおよびA306Vをもつ配列番号2に対応する。

【0094】

詳細な記載

SHC/HAC酵素およびそれらのバリエーション

本明細書に使用されるとき、用語「SHC酵素」は、例えばAlicyclobacillus acidocaldarius(Aac)などの好熱性細菌中に、天然に存在する野生型(WT)スクアレンホペンシクラーゼ酵素を意味する。ホモファルネソールのアンブロックスへの環化において作用するSHCはまた、モファルネソールアンブロックスシクラーゼ(HAC)酵素と称されることもある。したがって、用語「SHC/HAC酵素」が、本明細書に使用されることもある。

【0095】

本明細書に使用されるとき、用語「バリエーション」は、あるポリペプチドからアミノ酸配列における1以上の変化または改変によって、それが由来するポリペプチドとの比較において相違するポリペプチドとして理解されるべきである。バリエーションが由来するポリペプチドはまた、親のまたは参照のポリペプチドとしても知られている。典型的にはバリエーションは、人工的に、好ましくは遺伝子技術的手段によって、構築される。典型的には、バリエーションが由来するポリペプチドは、野生型タンパク質または野生型タンパク質のドメインである。しかしながら、本開示において使用可能なバリエーションはまた、親のポリペプチドのもしくは人工的に構築されたバリエーションからの、ホモログ、オルソログ、またはパラログに由来することもあるが、ただしバリエーションは親のポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を呈する。アミノ酸配列における変化は、アミノ酸の交換(置換)、挿入、欠失、N末端切断型、もしくはC末端切断型、またはこれら変化のいずれかの組み合わせであってもよく、それらは1箇所または数箇所の部位にて生じていてもよい。

【0096】

本明細書に使用されるとき、用語「SHC/HAC酵素バリエーション」は、野生型SHC酵素(配列番号1によって表されるAac SHC酵素など)に由来するが、野生型SHC酵素と比較して1以上のアミノ酸改変を有する酵素を意味し、したがって原核生物中に天然に存在するものではない。表2は、本発明においてSHC/HAC酵素バリエーションを生成するために使用されてもよい野生型SHCのリストを与える。表3および16は、本発明においてSHC/HAC酵素バリエーションを生成するために使用されるべき好ましい野生型SHCのリストを与える。表3は、以下のSHC/HAC酵素を列挙する:配列番号1によって表されるAac SHC、配列番号13または384によって表されるZmo SHC1、配列番号15によって表されるZmo SCH2、配列番号16によって表されるBjp SHC、配列番号17または18によって表されるB

10

20

30

40

50

urkhoderia ambifaria SHC、配列番号19によって表されるBacillus anthracis SHC、配列番号20によって表されるFrankia alni SHC、配列番号21によって表されるRhodopseudomonas palustris SHC、配列番号22によって表されるGmoSCO SHC、配列番号23によって表されるTel SHC、配列番号24によって表されるApaSHC1、配列番号25によって表されるBmeSHC、配列番号26によって表されるSalSHC、配列番号27によって表されるApaSHCA、配列番号28によって表されるBamSHC1、配列番号29によって表されるBamSHC2、配列番号30によって表されるPcaSHC2(またはSyntrophotalea carbinolica DSM 2380)、配列番号31によって表されるRpaSHC1、配列番号32によって表されるScoSHC、配列番号33によって表されるSfuSHC、配列番号34によって表されるTtuSHC。本発明においてSHC/HAC酵素バリエーションを生成するために使用されるべき、より好ましい野生型SHCは、次である:配列番号1によって表されるAaCSHC、配列番号13によって表されるZmoSHC1、配列番号15によって表されるZmoSCH2、配列番号23によって表されるTel SHC、および配列番号32によって表されるScoSHC。

10

20

30

40

50

【0097】

1以上のアミノ酸改変は、例えば、基質(例として、EEH)に対する酵素活性を改良する(modify)(例として、増大させる)ものであってもよい。本発明の文脈において、SHC/HAC酵素バリエーションは、SHC/HACバリエーションに由来してもよい。SHC/HACバリエーションの例は、配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383を包含する。

【0098】

SHC/HAC酵素および/またはSHC/HAC酵素バリエーションの活性を決定ならびに定量化するためのアッセイは、本明細書に記載されており、かつ当該技術分野において知られている。一例として、SHC/HAC酵素および/またはSHC/HAC酵素バリエーションの活性は、精製されたSHC/HAC酵素または酵素バリエーションあるいはSHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションを産生している宿主細胞または完全組換え宿主生物からの抽出物を、適切な基質とともに適切な条件下でインキュベートすることと、反応産物の分析を(例として、ガスクロマトグラフィー(GC)分析またはHPLC分析によって)実行することとによって決定され得る。SHC/HAC酵素および/またはSHC/HAC酵素バリエーションの活性のアッセイならびに反応産物の分析のさらなる詳細は、例において提供されている。これらのアッセイは、組換え宿主細胞(例として、E.coli)においてSHC/HAC酵素バリエーションを産生することを包含する。

【0099】

本明細書に使用されるとき、用語「活性」は、酵素が基質と反応して所望の産物を提供する能力を意味する。活性は、所望の産物の形成を監視するための活性試験として知られているもので決定され得る。本開示のSHC/HAC酵素の誘導体は、ホモファルネソール(例として、EEH)を環化することで(-)-アンブロックスにしてHAC活性などの生物活性を実証するそれらの能力によって特徴付けられてもよい。本開示のSHC/HAC酵素の誘導体は、ビスホモファルネソール(例として、E,E-ビスホモファルネソール)を環化することでアンブラオキシドにするそれらの能力によって特徴付けられてもよい。

【0100】

本出願の文脈において、SHC/HACバリエーションの活性または生物活性は、それが由来する野生型、親、参照のSHC/HACの対応する活性または生物活性と、同じ条件下で比較される。野生型SHC/HAC酵素の例は、表2、3、または16において同定されている。態様において、野生型SHC/HAC酵素は、配列番号1によって表されるか、または配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、1

00、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310のいずれかによって表されるものである。本発明のSHC/HACバリエーションを創作するために使用される親または参照のSHC/HAC酵素の例は、配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383のいずれかによって表されてもよい。

10

20

【0101】

「生物活性」は、本明細書に使用されるとき、ポリペプチドが呈してもよいいずれかの活性を指し、限定せずに次を包含する：酵素活性；基質特異性、選択性（基質選択性および/または産物選択性など）、変換率（EEH:EZH変換比率など）、収率、別の化合物への結合活性（例として、別のポリペプチドへの結合、とりわけ受容体への結合、または核酸への結合）；阻害活性（例として、酵素阻害活性）；活性化させる活性（例として、酵素を活性化させる活性）；あるいは毒性効果。バリエーションが、かかる活性を親または野生型または参照のポリペプチドと同じ程度まで呈することは要されない。バリエーションは、これが親ポリペプチドの活性の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、または少なくとも200%程度の関連活性を呈する場合、本出願の文脈内においてバリエーションと見なされる。同じく、バリエーションは、これが親ポリペプチドの活性の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、または少なくとも200%程度の関連生物活性を呈する場合、本出願の文脈内においてバリエーションと見なされる（誘導体およびバリエーションという用語は、本開示を通してずっと互換的に使用されるため）。

30

40

【0102】

態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照SHC酵素（例として、AacSHC/AHC酵素などの野生型SHC/HAC酵素、または知られているSHC/HAC酵素バリエーションもしくはそのバリエーションが由来する親SHC）を使用して得られる収率と比較して、より良好な収率（すなわち、増大した収率）を示す。用語「収率」は、供給原料のグラム当たりの回収可能な産物（すなわち（-）-アンブロックスまたはアンブラオキシド）のグラム（これはパーセントモル変換率として算出され得る）を指す。この文脈において、「増大」は、参照SHC酵素を使用して得られる収率の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも

50

も120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも400%の増大を意味してもよい。

【0103】

態様において、「選択性」は「産物選択性」を指し、数種の基質異性体の混合物から実質的に富化された形態/主たる形態(「産物選択性」)で記載されるとおりの酵素触媒法(enzymatically catalyzed method)において具体的な化合物(例として、(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシド)を産生する能力を記載する。態様において、ホモファルネソール基質異性体の混合物は、以下の混合物の1以上から選択される: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。

10

【0104】

好ましい態様において、「選択性」は「産物選択性」を指し、比率が80:20または90:10のEEH:EZH混合物から実質的に富化された形態/主たる形態(「産物選択性」)で記載されるとおりの酵素触媒法(enzymatically catalyzed method)において具体的な化合物(例として(-)-アンブロックス、すなわち化合物(I))を産生する能力を記載する。

【0105】

この文脈内の、「実質的に富化された形態/主たる形態」は、WT SHCの酵素バリエーションの環化反応の結果として形成される総産物が、例えば、本質的に次からなるか、または次からなることを意味してもよい:

20

- 上に同定されるホモファルネソール基質異性体混合物(好ましくはEEH:EZH、より好ましくは比率が80:20または90:10のもの)のいずれかを使用したときの、本明細書に記載の式(I)で表される化合物((-)-アンブロックス)、あるいは
- 上に同定されるホモファルネソール基質異性体混合物(好ましくはEEH:EZH、より好ましくは比率が80:20または90:10のもの)のいずれかを使用したときの、本明細書に記載の式(I)で表される化合物((-)-アンブロックス)および式(III)で表される化合物。

【0106】

それは、式(II)および(IV)で表される化合物が、プロセスの終了時でも、プロセスの最初の3、4、5または6時間または12時間または18時間の最中でも検出可能ではないことがあることを意味する。式(I)、(II)、(III)、および(IV)で表される化合物の検出は、当業者に知られている技法、好ましくは実験パートにおいて使用される技法を使用してなされてもよい。それはまた、いずれの下流処理ステップの不在下でも、式(I)で表される化合物のみ、または式(I)および(III)で表される化合物のみが産生されることも意味する。これは、下流処理(DSP)が、基質変換の程度と基質の変換比率とがともに増大しているから簡素化されてもよいことを意味する。換言すれば、DSPは、反応終了時に存在する未反応ホモファルネソールの量が低減されることもあるため、簡素化される。未反応ホモファルネソールは、形成された固体の(-)-アンブロックスの少なくとも一部を溶解すること、ならびに形成された固体の(-)-アンブロックスはまた、他の液体副産物にも溶解することもあるが、それら(例として、化合物IIおよび/またはIV)が存在しない場合、DSPステップを簡素化することもあることが知られている。

30

40

【0107】

この文脈において、「下流処理ステップ」は、固体(-)-アンブロックスの、未反応ホモファルネソール基質からの分離、ならびに(-)-アンブロックスの、他の副産物(例として、化合物IIおよび/またはIIIおよび/またはIV)からの分離を意味する。DSPステップは、遠心分離、濾過、蒸気もしくは有機溶媒の抽出または蒸留、あるいは選択的結晶化ステップのうち1以上を包含してもよいが、これらに限定されない。この文脈において、簡素化されたDSPの例は、蒸留ステップが、産生された副産物から(-)-アンブロックスを分離することより、未反応ホモファルネソールから(-)-アンブロックスを分離することの方が

50

効率的なこともある場合である。これらの下流処理ステップの各々は、後に本明細書に定義される。例示の下流処理ステップは、WO2022/023464に提供されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0108】

態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照SHC酵素(例として、配列番号1によって表されるAacSHC/AHC酵素などの野生型SHC/HAC酵素、または配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるいずれか他の野生型SHC/HAC酵素、または知られているSHC/HAC酵素バリエーション、またはそのバリエーションが由来する親SHC、例えば、配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるいずれかのSHC/HAC)を使用して得られる産物選択性と比較し、増大された産物選択性(すなわち、(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドに対して増大された選択性)を示す。用語「産物選択性」はまた、形成された総産物のグラム当たりの回収可能な産物(すなわち(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシド)のグラム(これはパーセントモル変換率として算出され得る)をも指す。この文脈において、「増大」は、参照SHC酵素を使用して得られる収率の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも400%の増大を意味してもよい。

【0109】

態様において、「選択性」は、本明細書に記載のと通りの酵素触媒法において、複数の基質異性体/数種の基質異性体の混合物(plurality/mixture of several substrate isomers)の中から、ある具体的な基質異性体(例として、EEH異性体)を優先的に変換して特定の産物にする能力(「基質選択性」)を意味する。より具体的に言うと、これは、具体的な産物(-)-アンブロックスが、数種の基質異性体の混合物から特定の基質(EEH)異性体への酵素変換に関し、富化されていることを意味する。

【0110】

したがって、酵素または酵素バリエーションの「基質選択性」は、酵素が少なくとも2つの別個の基質異性体を含む混合物と接触している間に、酵素または酵素バリエーションが、別の

基質異性体と比較して、ある具体的な基質異性体と反応する能力を指す。例えば、EEHに対してホモファルネソールの他の異性体よりも選択的であるか、もしくはビスEEHに対してビスホモファルネソールの他の異性体よりも選択的である、WT SHC酵素(配列番号1によって表されるもの、または表2、3、もしくは16に開示されるSHC/HACのいずれかによって表されるもの、または配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310によって表されるものなど)、あるいはWT SHCの酵素バリエーション(配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383のいずれかによって表されるものなど)は、WT SHC酵素またはWT SHCの酵素バリエーションが、EEHをホモファルネソールの他の異性体より変換しそうであるか、またはビスEEHをビスホモファルネソールの他の異性体より変換しそうであることを意味する。態様において、ホモファルネソールの少なくとも2つの別個の基質異性体を含む、ホモファルネソール基質異性体の混合物は、EEH異性体を含み、かつ以下の混合物の1以上から選択される: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約55:45、約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。【0111】

例えば、WTのまたは参照もしくは親SHCの酵素バリエーションの、ホモファルネソールの少なくとも2つの別個の基質異性体を含む混合物(該混合物はEEHを含む)との反応の結果として形成される全産物のwt%は、対応するWTまたは親もしくは参照のSHC酵素の、EEHを含む同じ混合物との反応の結果として形成される全産物のwt%より、少なくとも約1パーセントポイント大きくてもよい。例えば、該酵素バリエーションの反応の結果として形成される総産物のwt%は、WTまたは参照もしくは親のSHCの、EEHを含む同じ混合物との反応の結果として形成される総産物のwt%より、少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4パーセントポイント大きくてもよい。例えば、該酵素バリエーションの反応の結果として形成される総産物のwt%は、WTまたは参照もしくは親のSHCの、EEHを含む同じ混合物との反応の結果として形成される総産物のwt%より、最大約40、または最大約30、または最大約20、または最大約15、または最大約10パーセント

10

20

30

40

50

10

20

20

30

40

の基質異性体を含む混合物(該混合物はEEHを含む)との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%より少なくとも約1パーセントポイント大きくてもよい。例えば、該WTまたは参照もしくは親SHCの酵素バリエーションの、EEHを含む該混合物との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%は、該WTまたは参照もしくは親のSHCの、EEHを含む同じ混合物との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%より、少なくとも約2、または少なくとも約3、または少なくとも約4パーセントポイント大きくてもよい。例えば、WT SHCの該酵素バリエーションの、EEHを含む該混合物との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%は、該WTまたは該参照もしくは親のSHCの、EEHを含む同じ混合物との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%より、最大約40、または最大約30、または最大約20、または最大約15、または最大約10パーセントポイントまで、大きくてもよい。例えば、該WTまたは該親もしくは参照SHCの該酵素バリエーションの、EEHを含む該混合物との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%は、該WTまたは該参照もしくは親のSHCの、EEHを含む同じ混合物との反応の結果として形成される(-)-アンブロックスのwt%より、約1から約40パーセントポイントまで、または約2から約30パーセントポイントまで、または約3から約20パーセントポイントまで、または約4から約10パーセントポイントまで、大きくてもよい。これらすべての態様において、ホモファルネソールの少なくとも2つの別個の基質異性体を含む、ホモファルネソール基質異性体の混合物は、EEH異性体を含み、かつ以下の混合物の1以上から選択される: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約55:45、約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。

10

20

30

40

50

【0114】

WT SHC/HACの酵素バリエーション(配列番号1、もしくは13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310によって表されるものなど)の、またはそれらの親もしくは参照SHC/HAC(配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるものなど)の選択性はまた、各酵素を使用する反応のEEH:EZH変換比率(すな

わち、EEHの%変換:EZHの%変換)またはビスEEH:ビスEZH変換比率(すなわち、ビスEEHの%変換:ビスEZHの%変換)を比較することによって、対応するWT SHC/HACまたは対応する参照/親SHC/HAC酵素の選択性とも比較されてもよい。これは、反応が完了したときの反応混合物中に残存するEEHとEZHとの量またはビスEEHとビスEZHとの量を測定することによって決定されてもよい。大抵、反応は18時間後または20時間後に完了する。代替的に、WT SHC/HACの酵素バリエーション(配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310によって表されるものなど)の、または参照もしくはバリエーションSHC/HAC(配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるものなど)の選択性はまた、EEH(式IおよびIVで表される化合物)とEZH(式IIおよびIIIで表される化合物)との夫々の変換、またはビスEEH(式XおよびXIIで表される化合物)とビスEZH(XIおよびXIII)との夫々の変換から生じる産物の比率を比較することによって、該対応するWTまたは参照もしくは親SHC/HACの選択性とも比較されてもよい。

【0115】

WTのまたは参照もしくは親SHC/HACのSHC/HAC酵素バリエーションは、例えば、ホモファルネソールの少なくとも2つの別個の基質異性体を含むホモファルネソールの混合物(該混合物はEEHおよびEZHを含む)から(-)-アンブロックスを作製するためのプロセスにおいて、少なくとも約2.0のEEH:EZH変換比率を提供する。態様において、ホモファルネソールの少なくとも2つの別個の基質異性体を含む、ホモファルネソール基質異性体の混合物は、EEH異性体およびEZH異性体を含み、かつ以下の混合物の1以上から選択される: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]。態様において、混合物は、EEHおよびEZHを含む。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約55:45、約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。

【0116】

例えば、WTの、または参照もしくは親のSHC/HACの酵素バリエーションは、上に定義されるとおりの混合物から(-)-アンブロックスを作製するためのプロセスにおいて、少なく

10

20

30

40

50

とも約2.5、または少なくとも約3.0、または少なくとも約3.5のEEH:EZH変換比率を提供してもよい。態様において、混合物は、EEHおよびEZHを含む。例えば、該WT SHC/HACのまたは該参照もしくは親SHC/HACの酵素バリエーションは、上に定義されたとおりの混合物から(-)-アンブロックスを作製するためのプロセスにおいて、最大約5.0まで、または最大約4.5まで、または最大約4.0までのEEH:EZH変換比率を提供してもよい。態様において、該混合物は、EEHおよびEZHを含む。例えば、該WTのまたは該参照もしくは親SHC/HACの酵素バリエーションは、上に定義されたとおりの混合物から(-)-アンブロックスを作製するためのプロセスにおいて、約2.0から約5.0まで、または約2.5から約4.5まで、または約3.0から約4.0まで及ぶEEH:EZH変換比率を提供してもよい。態様において、該混合物は、EEHおよびEZHを含む。これは、例えば、EEHおよびEZHを含む混合物から(-)-アンブロックスを作製するためのプロセスにおいて、AacSHCによって提供される変換比率とは対照的であってもよく、前記変換比率は、例えば約2.0未満であってもよい。

10

【0117】

とりわけ、WT SHC酵素またはWT SHC酵素バリエーションが、WT AacSHCおよび/またはWT AacSHCのバリエーションと比較して、ホモファルネソールの他の異性体よりもEEHに対してより高い選択性を有する場合、野生型SHC/HAC酵素(例として、SHC/HAC酵素バリエーションが由来してもよいもの)は、TelSHC1、ApaSHC1、ZmoSHC1、ZmoSHC2、BjaSHC(またはBjpSHC)、GmoSHC BmeSHC、SalSHC、ApaSHCAから選択されてもよい。例えば、WT SHC酵素またはWT SHC酵素バリエーションが、WT AacSHCおよび/またはWT AacSHCのバリエーションと比較して、ホモファルネソールの他の異性体よりもEEHに対してより高い選択性を有する場合、野生型SHC/HAC酵素(例として、SHC/HAC酵素バリエーションが由来してもよいもの)は、ZmoSHC1、BjaSHC(BjpSHC)、GmoSHC、ApaSHC1、およびBmeSHCから選択されてもよい。

20

【0118】

態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照SHC酵素(例として、野生型SHC/HAC酵素、たとえば、配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310によって表される)、または知られているSHC/HAC酵素バリエーション、またはそのバリエーションが由来する親SHC(配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381

30

40

50

、382、もしくは383によって表されるものなど)の変換率と比較して、増大したEEH変換率(または増大したビスEEH変換率)を示す。用語「変換率」は、生体触媒のグラムあたりおよび時間単位あたりの変換された基質(すなわち、EEHまたはビスEEH)の量(これはパーセントモル変換率として算出され得る)を指す。この文脈において、「増大」は、参照SHC酵素を使用して得られる変換率の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも400%の増大を意味してもよい。

【0119】

態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、同じ基質に対する参照SHC酵素(例として、野生型SHC/HAC酵素、たとえば、配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるもの、または知られているSHC/HAC酵素バリエーション、またはそのバリエーションが由来する親SHC、たとえば、配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるもの)の特異性と比較して、それらの基質EEH(またはビスEEH)に対する増大した特異性を示す。用語「基質特異性」はまた、酵素触媒反応のある時点にて、または該反応のある「区間」の間中、当初から存在する基質のグラムあたりの、ある具体的な変換基質異性体(すなわち、EEHまたはビスEEH)の量も指す。とりわけ、該選択性は、基質の当初量の1~99%、2~95%、3~90%、5~85%、10~80%、15~75%、20~70%、25~65%、30~60%、または40~50%の変換に対応する「区間」の間中に観察されてもよい。態様において、「区間」は、1時間から8時間まで、または2時間から7時間まで、または3時間から6時間までであってもよい。態様において、「区間」は6時間である。この文脈において、「増大」は、参照SHC酵素を使用して得られる基質特異性の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも400%の増大を意味してもよい。

【0120】

追加の態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照SHC酵素(例として、野生型AacSHC(配列番号1)、あるいは215G2 AacSHC(配列番号3)、あるいはSHC#65(配列番号2)、あるいはそのバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば、表2もしくは3もしくは16において同定されるかまたは配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310によって表される以下の野生型SHC/HACのいずれか、あるいは以下の配列番号47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383のいずれかなどのバリエーションに由来する)と比べて、改良された(例として、増大した)産生能を示す。用語「産生能」は、生物変換時間(すなわち、基質が加えられた後の時間)の時間当たりの反応能(reaction capacity)のリットル当たりのグラム単位での回収可能な産物(すなわち、(-)-アンプロックスまたはアンブラオキシド)の量を指す。用語「産生能」はまた、反応に使用される生体触媒のグラム当たりの生物変換時間(すなわち、基質が加えられた後の時間)の時間当たりの反応能のリットル当たりのグラム単位での回収可能な産物の量も指す。この文脈において、「増大」は、参照SHC酵素を使用して得られる産生能の少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも30%、少なくとも40%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも100%、少なくとも110%、少なくとも120%、少なくとも130%、少なくとも140%、少なくとも150%、少なくとも200%、または少なくとも400%の増大を意味してもよい。

10

20

30

40

50

【0121】

態様において、本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションは、次を呈する:

参照SHC酵素(例として、野生型SHC、たとえば配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、1

54、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるもの、215G2 AacSHCもしくはSHC#65、またはバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるもの)と比較して、

- EEHに対する(またはビスEEHに対する)、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- (-)-アンブロックス(またはアンブラオキシド)に対する、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 基質の具体的な異性体に対する、ホモファルネソールまたはビス-ホモファルネソール以外の基質が使用されるとき(例として、エチル-ホモファルネソール、ヒドロキシファルネシルアセトン等 - 例えば夫々W02021/110858およびW02021/209482を見よ)に増大される特異性、
- 増大される産生能、および/または
- 反応の最初の3~6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、EEH(もしくはビスEEH)の増大された変換度、ならびにEEH(またはビスEEH)の増大された変換率。

【0122】

態様において、本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションは次を呈する：

参照SHC酵素(例として、野生型AacSHC、または215G2 AacSHC、またはSHC#65、またはバリエーションが由来する親SHC酵素)と比較して、

- EEHに対する(またはビスEEHに対する)、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- (-)-アンブロックス(またはアンブラオキシド)に対する、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 基質の具体的な異性体に対する、ホモファルネソールまたはビス-ホモファルネソール以外の基質が使用されるとき(例として、エチル-ホモファルネソール、ヒドロキシファルネシルアセトン等 - 例えば夫々W02021/110858およびW02021/209482を見よ)に増大される特異性 - 増大される産生能、ならびに
- 反応の最初の3~6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、EEH(またはビスEEH)の変換の増大された程度、ならびに増大された変換。

【0123】

さらなる態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照SHC酵素(例として、野生型AacSHC(配列番号1)またはSHC#65(配列番号2)、215G2 AacSHC(配列番号3)、配列番号13または384によって表されるZmoSHC1、配列番号15によって表されるZmoSCH2、配列番号16によって表されるBjpSHC、配列番号17または18によって表されるBurkholderia ambifaria SHC、配列番号19によって表されるBacillus anthracis SHC、配列番号20によって表されるFrankia alni SHC、配列番号21によって表されるRhodopseudomonas palustris SHC、配列番号22によって表さ

10

20

30

40

50

れるGmoSCO SHC、配列番号23によって表されるTel SHC、配列番号24によって表されるApaSHC1、配列番号25によって表されるBmeSHC、配列番号26によって表されるSalSHC、配列番号27によって表されるApaSHCA、配列番号28によって表されるBamSHC1、配列番号29によって表されるBamSHC2、配列番号30によって表されるPcaSHC2(またはSyntrophotalea carbinolica DSM 2380)、配列番号31によって表されるRpaSHC1、配列番号32によって表されるScoSHC、配列番号33によって表されるSfuSHC、配列番号34によって表されるTtuSHC)の収率と比較して、改良された(すなわち、増大した)収率を示す。

【0124】

好ましい態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照AacSHC(配列番号1)またはSHC#65(配列番号2)、または215G2 AacSHC(配列番号3)、または配列番号13によって表されるZmoSHC1、または配列番号15によって表されるZmoSCH2、または配列番号23によって表されるTel SHC、または配列番号32によって表されるScoSHCの収率と比較して、改良された(すなわち、増大した)収率を示す。

【0125】

とりわけ、野生型SHC/HAC酵素(例として、SHC/HAC酵素バリエーションが由来してもよいもの)は、Alicyclobacillus acidocaldarius(Aac)SHC/HAC酵素、Zymomonas mobilis(Zmo)SHC/HAC酵素、Bradyrhizobium japonicum(Bjp/Bja)SHC/HAC酵素、Acetobacter pasteurianus(Apa)SHC/HAC酵素、Bacillus megaterium(Bme)SHC/HAC酵素、またはGluconobacter morbifer(Gmo)SHC/HAC酵素であってもよい。とりわけ、野生型SHC/HAC酵素(例として、SHC/HAC酵素バリエーションが由来してもよいもの)は、Alicyclobacillus acidocaldarius(Aac)SHC/HAC酵素であってもよい。

【0126】

用語「標的収率因子」は、得られた産物濃度と、反応媒体(reaction medium)中のSHC/HACバリエーション酵素(例えば、精製されたSHC/HAC酵素バリエーションまたはSHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞からの抽出物)の濃度との間の比率を指す。様々な態様において、本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションは、参照SHCタンパク質(例として、配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310 or 2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、

378、379、380、381、382、または383)の活性と比べて、酵素活性において改良された(例えばとして、増大した)倍数増加(fold increase)(例として、改良された/増大したホモファルネソールアンブロックスシクラーゼ(HAC)活性)を示す。活性におけるこの増大は、少なくとも:2、3、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、および/または100倍であってよい。

【0127】

本明細書に使用されるとき、用語「アミノ酸改変」は、参照アミノ酸配列のアミノ酸配列と比べて、2アミノ酸間の1以上のアミノ酸の挿入、1以上のアミノ酸の欠失、または1以上のアミノ酸の1以上の異なるアミノ酸との置換(これは、保存的もしくは非保存的であってよい)を意味する。置換は、参照配列のアミノ酸を、その同数のアミノ酸で、バリエーション配列において置き換える。参照のアミノ酸配列は、例えば、野生型(WT)アミノ酸配列(例えば、配列番号1、または配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310のいずれか)であってよく、あるいは、例えば、SHC/HAC酵素バリエーションの配列(例えば、Aacバリエーション - 配列番号2、または3、または47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383)それ自体であってよい。語「置換」は、語「置き換え」と同義語である。

【0128】

アミノ酸改変は、SHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列の、参照アミノ酸配列のアミノ酸配列との比較によって容易に同定され得る。

【0129】

保存アミノ酸の置換は、実例として、関与するアミノ酸残基の極性、電荷、サイズ、可溶性、疎水性、親水性、および/または両親媒性の性質における類似性に基いてなされてもよい。上に概説されたとおりの20の天然に存在するアミノ酸は、以下の6つの標準的なアミノ酸群へグループ化され得る:

- (1)疎水性:Met、Ala、Val、Leu、Ile;
- (2)中性の親水性:Cys、Ser、Thr;Asn、Gln;
- (3)酸性:Asp、Glu;
- (4)塩基性:His、Lys、Arg;

10

20

30

40

50

(5)鎖の配向に影響を及ぼす残基:Gly、Pro;および

(6)芳香族:Trp、Tyr、Phe。

【0130】

結果的に、本明細書に使用されるとき、用語「保存的置換」は、アミノ酸の、上に示される6つの標準的なアミノ酸群の同じ群内に列挙された別のアミノ酸による交換を意味する。例えば、AspのGluによる交換により1負電荷が、そのように改良されたポリペプチドにおいても保持される。加えて、グリシンおよびプロリンは、アルファ-ヘリックスを妨害するそれらの能力に基づき、相互に置換されてもよい。上の6群内のいくつかの好ましい保存的置換は、以下の下位群:(i)Ala、Val、Leu、およびIle;(ii)SerおよびThr;(iii)AsnおよびGln;(iv)LysおよびArg;ならびに(v)TyrおよびPhe内での交換である。知られている遺伝暗号と組換えおよび合成のDNA技法とを前提とした、手慣れた科学者は、保存アミノ酸バリエーションをコードするDNAを容易に構築し得る。

10

【0131】

好ましい態様において(例11に実証されるとおり)、野生型SHC、とりわけ配列番号1の野生型AacSHCのアミノ酸配列中の、一連の保存アミノ酸は、配列番号1の野生型AacSHCを参照することによって、L22、Q26、G30、W32、A44、L48、Q72、G76、W78、Y95、L98、G102、A113、I117、G121、G122、F129、T130、L134、A135、G138、W142、P146、W169、A170、R171、F217、D222、R237、I261、P263、P281、S309、P310、W312、D313、T314、A320、W339、Q344、G349、D350、W351、G361、G362、A364、F365、N369、Y372、P373、D374、D376、D377、W406、Q411、G415、A419、P433、D436、D442、P443、D447、V448、Q479、G483、W485、G487、R488、W489、G490、N492、Y495、G496、T497、L504、W522、Q527、G531、G532、W533、G534、E535、S539、Y540、G547、T552、T556、W558、A559、A565、L581、Q585、G589、W591、G600、F601、P602、F605、Y609、Y612、F616、P617、A620、およびR623を含む。

20

【0132】

好ましい態様において(例14に実証されるとおり)、5つの野生型SHC、とりわけ配列番号1の野生型AacSHC、配列番号13の野生型ZmoSHC1、配列番号15の野生型ZmoSHC2、配列番号23の野生型TelSHC、および配列番号32の野生型ScoSHCのアミノ酸配列中の一連の保存アミノ酸が提示される。

30

【0133】

本明細書に使用されるとき、「非保存的置換」または「非保存アミノ酸交換」は、アミノ酸の、上に示されるとおり6つの標準的なアミノ酸群(1)~(6)の異なる群に列挙される別のアミノ酸による交換として定義される。典型的には、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションは、開示されたSHC/HAC酵素バリエーションの生物学的機能(例として、HAC活性)を改変する非保存的置換を使用して調製される。容易に参照できるように、IUPAC-IUB生化学命名委員会(Biochemical Nomenclature Commission)によって推奨される1文字アミノ酸記号は、以下のとおり指し示される。3文字コードもまた、参照目的のために提供される。

40

【0134】

表1:アミノ酸の命名法

【表 1】

1文字コード	3文字コード	アミノ酸名
A	Ala	アラニン
C	Cys	システイン
D	Asp	アスパラギン酸
E	Glu	グルタミン酸
F	Phe	フェニルアラニン
G	Gly	グリシン
H	His	ヒスチジン
I	Ile	イソロイシン
K	Lys	リシン
L	Leu	ロイシン
M	Met	メチオニン
N	Asn	アスパラギン
P	Pro	プロリン
Q	Gln	グルタミン
R	Arg	アルギニン
S	Ser	セリン
T	Thr	トレオニン
V	Val	バリン
W	Trp	トリプトファン
Y	Tyr	チロシン

10

20

【0135】

アミノ酸置換などのアミノ酸改変は、PCR、遺伝子クローニング、cDNAの部位特異的変異誘発、宿主細胞のトランスフェクション、およびin vitroでの転写(かかる変化を参照配列へ導入してSHC/HAC酵素バリエーションをもたらすのに使用されてもよい)を包含する、組換え遺伝子技術の知られているプロトコルを使用し、導入されてもよい。酵素バリエーションは次いで、SHC/HAC機能活性についてスクリーニングされ得る。

【0136】

SHC/HAC酵素の好適な供給源は、表2、3、または16において同定されている。態様において、好適な供給源は、例えば、*Alicyclobacillus acidocaldarius*(Aac)、*Zymomonas mobilis*(Zmo)、*Bradyrhizobium japonicum*(Bjp)、*Gluconobacter moribifer*(Gmo)、*Burkholderia ambifaria*、*Bacillus anthracis*、*Methylococcus capsulatus*、*Frankia alni*、*Acetobacter pasteurianus*(Apa)、*Thermosynechococcus elongatus*(Tel)、*Streptomyces coelicolor*(Sco)、*Rhodospirillum rubrum*(Rpa)、*Teredinibacter turnerae*(Ttu)、*Pelobacter carbinolicus*(Pca)または*Syntrophotalea carbinolica* DSM 2380、*Bacillus megaterium*(Bme)、*Streptomyces albolongus*(Sal)、および*Tetrahymena pyriformis*(例えば、WO 2010/139719、US 2012/01345477、WO 2012/066059を見よ、これらの内容は参照により本明細書に組み込まれる)を包含する。

30

【0137】

とりわけ、SHC/HAC酵素(例として、SHC/HAC酵素バリエーションが由来してもよいSHC/HAC酵素)は、*Alicyclobacillus acidocaldarius*(Aac)SHC/HAC酵素、*Zymomonas mobilis* SHC/HAC(ZmoSHC1)酵素、*Bradyrhizobium japonicum*(BjpもしくはBja)SHC/HAC酵素、または*Gluconobacter moribifer*(Gmo)SHC/HAC酵素、または*Acetobacter pasteurianus* SHC/HAC(ApaSHC1)酵素、または*Bacillus megaterium*(Bme)SHC/HAC酵素であってもよい。とりわけ、SHC/HAC酵素(例として、SHC/HAC酵素バリエーションが由来してもよいSHC/HAC酵素)は、*Alicyclobacillus acidocaldarius*(Aac)SHC/HAC酵素であってもよい。この酵素は配列番号1によって表される。

40

【0138】

50

容易に参照できるように、称号「AacSHC」は、*Alicyclobacillus acidocaldarius*(Aac)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよく、「ZmoSHC」は、*Zymomonas mobilis*(Zmo)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよく、「BjpSHC」または「BjaSHC」は、*Bradyrhizobium japonicum*(Bjp)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよく、「ApaSHC」は、*Acetobacter pasteurianus*(Apa)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよく、「BmeSHC」は、*Bacillus megaterium*(Bme)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよく、「SalSHC」は、*Streptomyces albolongus*(Sal)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよく、および「GmoSHC」は、*Gluconobacter moribifer*(Gmo)SHC/HAC酵素を指すために使用されてもよい。

【0139】

AacSHC、ZmoSHC、およびBjpSHCの酵素配列は、BASF WO 2010/139719、US 2012/01345477A1、Seitz et al(上に引用されるとおり)、およびSeitz(上に引用されるとおりの2012 PhD thesis)に開示される。2つの異なる配列は、ZmoSHCについて開示されており、ZmoSHC1およびZmoSHC2と称される。GmoSHC/HAC酵素配列は、WO 2018/157021に開示される。SalSHC酵素は、Liu et al(2020):A Novel Soluble Squalene-Hopene Cyclase and Its Application in Efficient Synthesis of Hopene, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol 8, article 426, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00426>)に開示される。

【0140】

表2.野生型(WT)SHC酵素の供給源および受託番号。

【表2-1】

配列番号	供給源の生物	NCBI受託番号
69	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EDP50814.1
105	<i>Bacillus subtilis</i>	AAB8444.1
19	<i>Bacillus anthracis</i>	AAP27368.1
186	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AAR34018.1
185	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AAR36453.1
92	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	AAS42477.1
91	<i>Bacillus cereus</i> E33L	AAU16998.1
96	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	AAU23777.1
13	<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ZM4 ATCC 31821	AAV90172.1
191	<i>Gluconobacter oxydans</i>	AAW61994.1
228	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	AAZ64302.1
211	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	ABA05523.1
65	<i>Anabaena variabilis</i>	ABA24268.1
213	<i>Nitrosococcus oceanus</i> ATCC 19707	ABA57818.1
30	<i>Pelobacter carbinolicus</i> or <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380	ABA87615.1
223	<i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380	ABA87701.1
142	<i>Burkholderia lata</i>	ABB06563.1
143	<i>Burkholderia lata</i>	ABB10136.1
178	<i>Geobacter metallireducens</i>	ABB30662.1
179	<i>Geobacter metallireducens</i>	ABB33038.1
216	<i>Nitrospira multififormis</i> ATCC 25196	ABB75845.1
238	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	ABC20867.1
236	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	ABD06434.1
167	<i>Frankia casuarinae</i>	ABD10207.1
237	<i>Rhodospseudomonas palustris</i>	ABD87279.1
145	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	ABE35912.1
209	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	ABE63461.1
230	<i>Ralstonia metallidurans</i>	ABF11015.1
231	<i>Ralstonia metallidurans</i>	ABF11268.1
146	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> Ellin345	ABF40741.1
239	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941	ABG05671.1

【0141】

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

268	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	ABG50159.1
214	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	ABI59752.1
192	<i>Granulibacter thesedensis</i>	ABI63005.1
29	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ABI91648.1
31	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ABJ08391.1
148	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076	ABJ82180.1
149	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076	ABJ82254.1
33	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	ABK17672.1
33	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	ABK18414.1
58	<i>Acidothermus cellulosyticus</i>	ABK53469.1
106	<i>Bacillus thuringiensis</i> str. Al Hakam	ABK86448.1
224	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	ABK98395.1
225	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	ABK98811.1
135	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1	ABM48844.1
187	<i>Geotalea uranireducens</i> Rf4	ABQ25226.1
270	<i>Acidiphilium cryptum</i>	ABQ30890.1
16	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	ABQ33590.1
95	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	ABS22481.1
66	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	ABS28257.1
75	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	ABS74269.1
100	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	ABV62529.1
169	<i>Frankia</i> sp.	ABW14125.1
168	<i>Frankia</i> sp.	ABW15063.1
246	<i>Acaryochloris marina</i>	ABW29816.1
137	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	ABX16859.1
136	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	ABX19650.1
114	<i>Bacillus mycoides</i> KBAB4	ABY44436.1
205	<i>Methylobacterium</i> sp.	ACA20611.1
253	<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesi</i> ATCC 27952	ACA52082.1
128	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ACA95661.1
204	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	ACB27373.1
155	<i>Crocospaera subtropica</i> ATCC 51142	ACB53858.1
125	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	ACB68303.1
203	<i>Methylobacterium populi</i>	ACB79998.1
116	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039	ACB96717.1
138	<i>Burkholderia phymatum</i>	ACC73258.1
217	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	ACC84529.1
139	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	ACD21317.1
198	<i>Methyloacidiphilum inferorum</i>	ACD82457.1
177	<i>Geobacter lovleyi</i>	ACD95949.1
234	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ACF02757.1
176	<i>Geobacter bemidjensis</i>	ACH40355.1
57	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	ACH84004.1
189	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	ACI51585.1
219	<i>Afipia carboxidovorans</i>	ACI93782.1
206	<i>Methylocella silvestris</i>	ACK52150.1
158	<i>Rippkaea orientalis</i> PCC 8801	ACK66841.1
156	<i>Gloeotheca citrififormis</i> PCC 7424	ACK71719.1
199	<i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	ACK83067.1
200	<i>Methylobacterium extorquens</i>	ACK86232.1
93	<i>Bacillus cereus</i> G9842	ACK95843.1

【 0 1 4 2 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

161	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	ACL45896.1
202	<i>Methylobacterium nodulans</i>	ACL61886.1
180	<i>Geotalea daltonii</i> FRC-32	ACM21577.1
182	<i>Geotalea daltonii</i> FRC-32	ACM22003.1
34	<i>Teredinibacter turnerae</i>	ACR13362.1
133	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	ACR30752.1
132	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	ACR32572.1
221	<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	ACS99948.1
184	<i>Geobacter</i> sp. M21	ACT16952.1
150	<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928	ACU75510.1
240	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	ACU97316.1
162	<i>Rippkaea orientalis</i> PCC 8802	ACV02092.1
243	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	ACZ39437.1
309	<i>Komagataeibacter xylinus</i> E25	AHI26287.1
278	<i>Bacillus thuringiensis</i>	AJI35613.1
286	<i>Komagataeibacter nataicola</i>	AQU88860.1
267	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	BAA17978.1
218	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	BAB72732.1
23	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BAC09861.1
245	<i>Streptomyces avermitilis</i> NBRC 14893	BAC69361.1
188	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	BAC91998.1
74	<i>Aspergillus oryzae</i>	BAE63941.1
59	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	BAF93209.1
251	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 53653	BAG17791.1
164	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	BAG68223.1
122	<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 100599	BAH44778.1
120	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283-01	BAH98349.1
24または27	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	BAH99456.1
227	<i>Goniophlebium niponicum</i>	BAI48070.1
226	<i>Goniophlebium niponicum</i>	BAI48071.1
119	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CAA60250.1
64	<i>Alcyclobacillus acidoterrestis</i>	CAA61950.1
207	<i>Methylococcus capsulatus</i>	CAA71098.1
235	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	CAA71101.1
32	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAB39697.1
233	<i>Rhodopirellula baltica</i>	CAD74517.1
166	<i>Frankia alni</i> ACN14a	CAJ60090.1
165	<i>Frankia alni</i> ACN14a	CAJ61140.1
147	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	CAJ71215.1
229	<i>Cupriavidus necator</i> H16	CAJ96989.1
72	<i>Aspergillus niger</i>	CAK43501.1
121	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	CAL79893.1
241	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	CAM03596.1
190	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	CAP55563.1
154	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424	CAQ72562.1
130	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	CAR56694.1
129	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	CAR57099.1
201	<i>Methylobacterium extorquens</i>	CAX24364.1
255	<i>Streptomyces scabiei</i>	CBG68454.1
284	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CUW48332.1
287	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	AHI26287.1
77	<i>Bacillus cereus</i> G9241	EAL12758.1

【 0 1 4 3 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 4】

70	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EAL84865.1
71	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EAL86291.2
153	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	EAM53094.1
210	<i>Nitrobacter</i> sp.	EAQ34404.1
118	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	EAQ78122.1
117	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	EAQ81955.1
212	<i>Nitrococcus mobilis</i>	EAR22397.1
102	<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	EAR64404.1
67	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW07713.1
208	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	EAW20752.1
195	<i>Leptospirillum rubrum</i> .	EAY57382
127	<i>Burkholderia cenocepacia</i> PC184	EAY66961.1
131	<i>Burkholderia dolosa</i> AU0158	EAY71311.1
160	<i>Crocospaera chwakensis</i>	EAZ91809.1
103	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	EDL66148.1
69	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EDP50814.1
220	<i>Paenibacillus</i> sp.	EDS49994.1
123	<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10	EDT05097.1
134	<i>Burkholderia graminis</i> C4D1M	EDT12320.1
124	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	EDT37649.1
126	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	EDT42454.1
181	<i>Geobacter</i> sp. M21	EDV72707.1
101	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	EDW21137.1
256	<i>Streptomyces</i> sp.	EDX25760.1
265	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	EDX84551.1
159	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	EDX97382.1
157	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802	EDY02410.1
173	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	EDY05760.1
151	<i>Chthoniobacter flavus</i> Ellin428	EDY15838.1
152	<i>Chthoniobacter flavus</i> Ellin428	EDY22035.1
257	<i>Streptomyces</i> sp.	EDY46371.1
263	<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083	EDY55942.1
254	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486	EDY61772.1
196	<i>Leptospirillum</i> sp.	EDZ38599.1
141	<i>Burkholderia</i> sp. H160	EEA03553.1
242	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	EEB08219.1
140	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	EEC32728.1
163	<i>Desulfovibrio salexigens</i> DSM 2638	EEC62384.1
62	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> LAA1	EED08231.1
68	<i>Aspergillus flavus</i>	EED48353.1
172	<i>Geobacillus</i> sp.	EED61885.1
115	<i>Pedospaera parvula</i> Ellin514	EEF59508.1
61	<i>Histoplasma capsulatum</i> G186AR	EEH02950.1
79	<i>Bacillus cereus</i> m1293	EEK43841.1
76	<i>Bacillus wiedmannii</i>	EEK66523.1
82	<i>Bacillus cereus</i>	EEK77935.1
80	<i>Bacillus cereus</i>	EEK82938.1
84	<i>Bacillus cereus</i> m1550	EEK88307.1
81	<i>Bacillus cereus</i>	EEK99528.1
78	<i>Bacillus cereus</i> Rock3-42	EEL44583.1
90	<i>Bacillus cereus</i> Rock3-44	EEL49968.1
86	<i>Bacillus cereus</i> Rock4-18	EEL59884.1

【 0 1 4 4 】

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

85	<i>Bacillus cereus</i> F65185	EEL63943.1
88	<i>Bacillus cereus</i>	EEL69857.1
83	<i>Bacillus cereus</i>	EEL81079.1
89	<i>Bacillus cereus</i> AH1273	EEL92663.1
97	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048	EEL98438.1
98	<i>Bacillus pseudomyoides</i>	EEM04821.1
99	<i>Bacillus pseudomyoides</i> DSM 12442	EEM16144.1
107	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>tochigiensis</i> BGSC 4Y1	EEM21409.1
110	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	EEM27851.1
111	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>sotto</i> str. T04001	EEM40716.1
112	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>pakistani</i> str. T13001	EEM46814.1
109	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. T03a001	EEM52372.1
108	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>huazhongensis</i> BGSC 4BD1	EEM82653.1
113	<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200	EEM94969.1
174	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	EEN95021.1
175	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61	ACX79399.1
60	<i>Histoplasma capsulatum</i> H143	EER40510.1
308	<i>Zymomonas mobilis</i>	EER62728.1
194	<i>Leptospirillum ferrodiazotrophum</i>	EES53667.1
222	<i>Paenibacillus</i> sp. oral taxon 786	EES74793.1
56	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	EET25937.1
215	<i>Nitrosomonas</i> sp. AL212	EET32702.1
183	<i>Geobacter</i> sp. M18	EET34621.1
193	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ATCC 51888	EET65847.1
248	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	EEW70811.1
144	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	EFA54357.1
171	<i>Frankia</i> sp. Eu11c	EFA59089.1
170	<i>Frankia</i> sp. Eu11c	EFA59873.1
285	<i>Gluconobacter frateurii</i> NBRC 103465	GAD08844.1
272	<i>Acetobacter orleanensis</i> JCM 7639	GAN69910.1
272	<i>Acetobacter orleanensis</i> JCM 7639	GAN69910.1
293	<i>Thermoactinomyces</i> sp. Gus2-1	KFZ40906.1
285	<i>Gluconobacter frateurii</i> NBRC 103465	GAD08844.1
295	<i>Alieyclobacillus acidocaldarius</i>	P33247.4
232	<i>Rhizobium</i> sp.	P55348.1
271	<i>Acetobacter fabarum</i>	PAK78064.1
104	<i>Bacillus subtilis</i>	Q796C3.1
277	<i>Bacillus subtilis</i>	WP_004399534.1
288	<i>Methylobacillus fumariolicum</i>	WP_009061034.1
289	<i>Methylococcus capsulatus</i>	WP_010960137.1
23	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	WP_011058142.1
294	<i>Zymomonas mobilis</i>	WP_011241313.1
291	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	WP_011698842.1
274	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	WP_011720532.1
275	<i>Alieyclobacillus acidocaldarius</i>	WP_012811690.1
273	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	WP_012812952.1
290	<i>Sphaerobacter thermophilus</i>	WP_012872483.1
276	<i>Bacillus megaterium</i>	WP_013083001.1

【0 1 4 5】

【表 2 - 6】

280	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i>	WP_014100779.1
292	<i>Teredinibacter turnerae</i>	WP_015819476.1
281	<i>Cohnella thermotolerans</i>	WP_027091823.1
279	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	WP_029099368.1
282	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	WP_029761705.1
310	<i>Geobacillus vulcani</i>	WP_031409036
283	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_031409036.1
197	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	ZP_00052068.2
269	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136	ZP_02925563.1
94	<i>Bacillus coahuilensis</i>	ZP_03226483.1
249	<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	ZP_04684415.1
247	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	ZP_04697579.1
244	<i>Streptomyces albus</i>	ZP_04706071.1
261	<i>Streptomyces</i> sp. SPB74	ZP_04995097.1
260	<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	ZP_05001249.1
266	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	ZP_05035816.1
258	<i>Streptomyces</i> sp. AA4	ZP_05479203.1
262	<i>Streptomyces</i> sp. SPB78	ZP_05490781.1
259	<i>Streptomyces</i> sp.	ZP_05510126.1
252	<i>Streptomyces lividans</i>	ZP_05522220.1
264	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	ZP_05535608.1
250	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	ZP_05537325.1
307	<i>Gluconobacter morbifer</i>	EHH69691.1
55	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	IFO 3283-01
63	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	AAT70690.1
73	<i>Aspergillus niger</i>	CAK45506.1
87	<i>Bacillus cereus</i> Rock4-18	EEL59884.2

10

20

【0 1 4 6】

表 3. 好ましい野生型 (WT) SHC 酵素の供給源および受託番号。

【表 3 - 1】

SHC供給源の株 (SHC名)	参考文献 (および 参照により 本明細書に 組み込まれる)	受託番号	WO 2010139719 US2012/0135477(*) に、または本開示(**) に従う配列番号 (**)
<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> (AacSHC)	JP2009-060799 (Kao) Neumann <i>et al</i> Biol Chem (1986) 367; 723-729	NBRC15652	配列番号 1 **
<i>Zymomonas mobilis</i> (ZmoSHC1)	WO2010139719 US20120135477	ATCC31821 PF62207_2 Genpept 受託番号 AAV90172 AAF12829.1 AVZ42714.1	配列番号 1 * 配列番号 13** 配列番号 2 * 配列番号 14**
<i>Zymomonas mobilis</i> (ZmoSHC2)	Reipen <i>et al</i> (1995) Microbiology 141:155-161	EMBL/Genbank 受託番号 X80766	配列番号 15 **
<i>Bradryhizobium japonicum</i> (BjpSHC または BjaSHC)	WO2010139719 US2012/0135477	PF62207_5 ABQ33590.1	配列番号 5 * 配列番号 16**
<i>Burkholderia ambifaria</i>	WO2010139719 US2012/0135477		配列番号 6 * 配列番号 17**

30

40

【0 1 4 7】

50

【表 3 - 2】

<i>Burkholderia ambifaria</i>	WO2010139719 US2012/0135477		配列番号7* 配列番号18**
<i>Bacillus anthracis</i>	WO2010139719 US2012/0135477		配列番号8* 配列番号19**
<i>Frankia alni</i>	WO2010139719 US2012/0135477		配列番号9* 配列番号20**
<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	WO2010139719 US2012/0135477		配列番号10* 配列番号21**
<i>Gluconobacter morbifer</i> (WT GmoSHC)	WO2018157021	EHH69691.1	配列番号22**
<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (TelSHC)		BAC09861.1	配列番号23**
<i>Acetobacter pasteurianus</i> (ApaSHC1)		ASC07046.1	配列番号24**
<i>Bacillus megaterium</i> (BmeSHC)		WP_016763969	配列番号25**
<i>Streptomyces albolongus</i> SalSHC)		AZN28579	配列番号26**
<i>Acetobacter pasteurianus</i> ApaSHCA)		WP_003625617	配列番号27**
<i>Burkholderia ambifaria</i> BamSHC1)		AJY25620.1	配列番号28**
<i>Burkholderia ambifaria</i> (BamSHC2)		AB191648.1	配列番号29**
<i>Pelobacter carbinolicus</i> (PcaSHC2) or <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380		ABA87615.1	配列番号30**
<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (RpaSHC1)		ABJ08391.1	配列番号31**
<i>Streptomyces coelicolor</i> (ScoSHC)		CAB39697.1	配列番号32**
<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> (SfuSHC)		ABK17672.1	配列番号33**
<i>Teredinibacter turnerae</i> (TtuSHC)		ACR13362.1	配列番号34**

10

20

【0148】

野生型AacSHC、野生型ZmoSHC1、野生型ZmoSHC2、野生型BjpsHC、野生型GmoSHC、野生型TelSHC、および野生型ApaSHC1、野生型BmeSHC、野生型SalSHC、および野生型ApaSHCAの配列はまた、表3において本明細書にも開示される。

【0149】

最も好ましい野生型SHCは次である:AacSHC(配列番号1)、または配列番号13によって表されるZmoSHC1、または配列番号15によって表されるZmoSCH2、または配列番号23によって表されるTelSHC、または配列番号32によって表されるScoSHC。

【0150】

HoshinoおよびSato(2002、上に引用されるとおり)によって調製されたWT SHC配列のアライメントは、複数のモチーフが検出されたこと、およびコア配列Gln-X-X-X-Gly-X-Trp(これは、*Z.mobilis*と*A.acidocaldarius*との両方のSHC配列において6回見出された(Reipen et al 1995, Microbiology 141,155-161の図3を見よ))からなることを指し示す(Xはいずれかのアミノ酸であり得る)。HoshinoおよびSato(2002、上に引用されるとおり)は、芳香族アミノ酸がSHCにおいて異常に豊富であることと、SHCにおいて2つの特徴的モチーフに注目した:1つが特定のアミノ酸モチーフ[(K/R)(G/A)X2~3(F/Y/W)(L/IV)3X3QX2~5GXW]によって表されるQWモチーフであり、もう1つが、Wendtら(1997, Science 277,1811-1815および1999, J Mol Biol 286,175-187)がSHCのX線構造分析について報告したDXDDTAモチーフ(配列番号314)であることと、を報告する(Xはいずれかのアミノ酸であり得る)。DXDDTAモチーフは、SHC活性部位と相関するように見える。

30

40

【0151】

参照AacSHCタンパク質は、本明細書に使用されるとき、配列番号1に開示されるとおりの野生型AacSHCタンパク質を指すこともある。AacSHCは、SHCのホモファルネソール基質との生体触媒反応を通してアンブロックス誘導体の産生に有用なホモファルネソールアンブロックスシクラーゼ(HAC)の活性を有する。AacSHCの主反応は、アンブロックスを産生する、ホモファルネソールなどの線状基質または非線状基質の環化である。

【0152】

別の参照AacSHCタンパク質は、配列番号3に開示されるとおりのSHC/AHC酵素215

50

G2 SHCまたは215G2 SHCである。配列番号3は、突然変異M132R、A224V、およびI432Tをもつ配列番号1に対応する。

【0153】

別の参照AacSHCタンパク質は、配列番号2に開示されるとおりのSHC/AHC酵素バリエーション#65である。配列番号2は、置換M132R、A224V、I432T、A557T、およびR613Sをもつ配列番号1に対応し、本明細書中SHC/HAC酵素バリエーション#65またはSHC#65バリエーションと称されることもある。

【0154】

文言「機能的ホモログ」は、「機能的同等物」によってかまたは「ホモログ」によって置き換えられてもよい。

本明細書に記載の野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションの機能的ホモログはまた、例えば組換え宿主において、例えば(-)-アンブロックスを産生するための、環化反応における使用にも好適である。よって、組換え宿主は、上に記載のポリペプチドの機能的ホモログをコードする1以上の異種の核酸(単数もしくは複数)、および/または本明細書に記載のとおりSHC/HAC誘導体酵素をコードする異種の核酸を包含している。

【0155】

機能的ホモログは、参照ポリペプチドと配列同一性、任意に配列類似性を有し、かつ参照ポリペプチドの生化学的または生理学的な機能(単数もしくは複数)の1以上を実行するポリペプチドである。機能的ホモログおよび参照ポリペプチドは、天然に存在するポリペプチドであってもよく、配列同一性、任意に配列類似性は、収斂または発散の進化的事象に起因してもよい。そのため、機能的ホモログはときに、文献中、ホモログ、またはオルソログ、またはパラログと指定される。野生型をコードする配列の突然変異体によってコードされるポリペプチドなどの、天然に存在する機能的ホモログのバリエーションは、それら自体が機能的ホモログであってもよい。機能的ホモログはまた、あるポリペプチドに対し、コード配列の部位特異的変異誘発を介しても、または天然に存在する異なるポリペプチドに対し、コード配列からのドメインを組み合わせることによっても(「ドメインスワッピング(domain swapping)」)、創出され得る。本明細書に記載の機能的ホモログをコードする遺伝子を改良するための技法は知られており、なかでも、指向進化技法、部位特異的変異誘発技法、およびランダム変異誘発技法を包含し、所望されるやり方で、ポリペプチドの特定の活性を増大させるか、基質特異性を改変するか、発現レベルを改変するか、細胞内位置(subcellular location)を改変するか、またはポリペプチド:ポリペプチド相互作用を改良するのに有用であり得る。改良されたかかるポリペプチドは、機能的ホモログと見なされる。用語「機能的ホモログ」はときに、機能的に相同のポリペプチドをコードする核酸へ適用される。

【0156】

機能的ホモログは、ヌクレオチドおよびポリペプチドの配列アライメントの分析によって同定され得る。例えば、ヌクレオチドまたはポリペプチドの配列データベース上でクエリ(query)を実施することは、SHC誘導体ポリペプチド等をコードする核酸配列のホモログを同定し得る。

【0157】

ハイブリダイゼーションはまた、機能的ホモログを、および/または1つの指標として2つの核酸配列間の相同性を、同定するのに使用され得る。本明細書に開示のタンパク質のいずれかまたはその一部をコードする核酸配列は、標準的なハイブリダイゼーション技法に従いハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る。プローブの、試験供給源(例として、哺乳動物の細胞)からのDNAまたはRNAへのハイブリダイゼーションは、試験供給源中の、関係のあるDNAまたはRNAの存在の兆候である。ハイブリダイゼーション条件は当業者に知られており、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 6.3.1-6.3.6, 1991に見出され得る。中程度のハイブリダイゼーション条件は、2x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中30℃でのハイブリダイ

10

20

30

40

50

ゼーション、これに続く1xSSC、0.1%SDS中50℃での洗浄と等価なものとして定義される。高度にストリンジェントな条件は、6x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中45℃でのハイブリダイゼーション、これに続く0.2xSSC、0.1%SDS中65℃での洗浄と等価なものとして定義される。機能的ホモログを同定する配列分析はまた、関係のあるアミノ酸配列を参照配列として使用する非冗長データベースのBLAST、レシプロカル(Reciprocal)BLAST、またはPSI-BLASTの分析も伴い得る。アミノ酸配列は、いくつかの場合において、ヌクレオチド配列から推定される。40%より大きい配列同一性を有するデータベース中のそれらポリペプチドは、SHC/HAC生物変換反応における使用への好適性についてさらに評価するための候補である。アミノ酸配列の類似性は、ある疎水性残基の別の疎水性残基との置換、またはある極性残基の別の極性残基との置換などの、保存アミノ酸の置換を許容する。所望の場合、さらに評価されるべき候補数を狭めるために、かかる候補の手動の検査が実行され得る。手動の検査は、例えば保存された機能的ドメインを有するように見えるそれら候補を選択することによって実施され得る。

10

【0158】

典型的には、少なくとも約30%のアミノ酸配列同一性を呈するポリペプチドは、保存領域を同定するのに有用である。関連ポリペプチドの保存領域は、少なくとも30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%のアミノ酸配列同一性を呈する。いくつかの態様において、保存領域は、少なくとも、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%のアミノ酸配列同一性を呈する。配列同一性は、上および下に記述されるとおりに決定され得る。大抵、この文脈において、領域は、5から50アミノ酸まで、または10から150まで、または10から80まで、または10から100アミノ酸までを含んでいてもよい。

20

【0159】

本明細書に記載され、かつ本明細書に記載の方法において使用されるSHC/HAC酵素または酵素バリエーションは、例えば、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、2

30

40

50

92、293、294、295、296、307、308、309、310のアミノ酸配列、または配列番号47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383のいずれかのアミノ酸配列、またはそのバリエーション、ホモログ、突然変異体、誘導体、あるいはフラグメントに基づいていてもよい。

【0160】

加えて、産生される参照SHC酵素は、E.coliから産生されるアミノ酸配列に基づいていてもよい。

【0161】

遺伝子のヌクレオチド配列に関する「パーセント(%)同一性」は、配列をアラインし、かつ、最大のパーセント配列同一性を獲得するために必要ならばギャップ(gaps)を導入した後の、DNA配列中のヌクレオチドと同一である候補DNA配列中のヌクレオチドのパーセンテージとして定義されるが、配列同一性の一環としていずれの保存的置換も考慮しない。パーセントヌクレオチド配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野における技能の範囲内にある様々な手法で、実例として、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用し達成され得る。当業者は、比較される配列の完全長にわたり最大のアライメントを達成するのに必要とされるいずれのアルゴリズムも包含する、アライメントを測定するのに適切なパラメータを決定し得る。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は本明細書中、互換的に使用され、長さまたは翻訳後修飾(post-translational modification)を問わず、アミノ酸のいずれかのペプチド連鎖を意味する。

【0162】

本明細書に使用されるとき、用語「誘導体」は、バリエーションを包含するが、これに限定されない。用語「誘導体」および「バリエーション」は本明細書中、互換的に使用される。

【0163】

好ましい態様において、本開示において使用可能なバリエーション酵素は、アミノ酸配列における最大200個までの総数(最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、または200まで)の変化(改変)(すなわち、交換、挿入、欠失、N末端切断型、および/またはC末端切断型)を呈する。アミノ酸交換は、保存的および/または非保存的であってもよい。好ましい態様において、本開示において使用可能なバリエーションは、最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個までのアミノ酸交換(好ましくは保存アミノ酸変化)の差で、バリエーションが由来するタンパク質またはドメインと相違する。バリエーションは、加えてまたは代替的に、N末端切断型、C末端切断型、もしくは内部欠失、またはこれらいずれかの組み合わせであってもよい、アミノ酸の欠失を含んでいてもよい。N末端切断型、C末端切断型、および/または内部欠失を含むかかるバリエーションは、本出願の文脈において、「欠失バリエーション」または「フラグメント」と称される。用語「欠失バリエーション」および「フラグメント」は本明細書中、互換的に使用される。欠失バリエーションは、天然に存在するもの(例として、スプライスバリエーション)であってもよく、または人工的に、好ましくは遺伝子技術的手段によって構築されたものであってもよい。典型的には、欠失バリエーションが由来するタンパク質またはタンパク質ドメインは、野生型タンパク質である。しかしながら、本開示の欠失バリエーションはまた、親のポリペプチドのもしくは人工的に構築されたバリエーションからの、ホモログ、オルソログ、またはパラログに由来してもよいが、ただし、欠失バリエーションは、親のポリペプチドの少なくとも1つの生物活性を呈する。好ましくは、欠失バリエーション(またはフラグメント)は、そのN末端にて、および/またはそのC末端にて、および/または内部に、親ポリペプチドと比較して最大1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、または100個までのアミノ酸の欠失を有する。

【0164】

ある態様において、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエントは、置換のみを包含し、かついずれの欠失も挿入も包含しない。

【0165】

「バリエント」は、本明細書に使用されるとき、代替的にまたは加えて、バリエントが由来する親ポリペプチドとのある程度の配列同一性または類似性によって特徴付けられる。本開示のWT/参照SHC/HACまたはSHC/HAC誘導体のバリエントは、夫々の参照ポリペプチドと、もしくは夫々の参照ポリヌクレオチドと、少なくとも40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%同一性の配列同一性を有していてもよい。

10

【0166】

表現「少なくとも30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%の配列同一性」は、ポリペプチドおよびポリヌクレオチドの配列比較に関し、本明細書を通してずっと使用される。本明細書に開示の酵素またはタンパク質のいずれかのファミリーに属するポリヌクレオチドは、関係のある遺伝子またはタンパク質夫々とのその類似性に基づき同定され得る。例えば、同定は、配列同一性に基づき得る。ある好ましい態様において、本開示は、(a)本明細書に開示の野生型SHC/HAC酵素(例として、配列番号1、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、または本明細書に開示の表2、3、もしくは16に開示のいずれか他のSHC/HAC)のポリペプチドをコードする

20

30

40

50

核酸分子、(b)配列番号35のヌクレオチド配列、および(c)配列番号35の少なくとも30(例として、少なくとも30、40、50、60、80、100、125、150、175、200、250、300、400、500、600、700、800、850、900、950、1000、もしくは1010)ヌクレオチドのセグメント(または表2、3、もしくは16に開示されるとおりのSHC/HAC酵素をコードするヌクレオチド配列)を包含する核酸分子と、少なくとも30%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%同一の単離された核酸分子を特色とする。

10

【0167】

好ましくは、問題になっているポリペプチドおよび参照ポリペプチドは、連続的な一続きの20、30、40、45、50、60、70、80、90、100個の、またはそれ以上のアミノ酸にわたり、指し示された配列同一性または類似性を呈する。好ましくは、問題になっているポリヌクレオチドおよび参照ポリヌクレオチドは、連続的な一続きの60、90、120、135、150、180、210、240、270、300個の、またはそれ以上のヌクレオチドにわたり、指し示された配列同一性を呈する。2つの配列が比較され、参照配列が、配列同一性パーセンテージが算出されるべき配列との比較において特定されないケースにおいて、別様に具体的に指し示されない場合、配列同一性は、比較されるべき2つの配列のうちより長い方を参照して算出されるべきである。参照配列が指し示されている場合、配列同一性は、別様に具体的に指し示されない場合、参照配列(例として、配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、および表2、3、または16に開示されるとおりのいずれかのSHC/HAC酵素)の完全長に基づいて決定される。

20

30

40

【0168】

例えば、130アミノ酸からなるペプチド配列は、631アミノ酸残基をもつ野生型AacSHCの完全長のアミノ酸と比較すると、20.6%(130/631x100)の最大の配列同一性パーセンテージを呈することもあり、一方、300アミノ酸の長さをもつ配列が47.5%(300/631x100)の最大の配列同一性パーセンテージを呈することもある。

50

【0169】

ヌクレオチド配列およびアミノ酸配列の同一性、すなわち配列同一性のパーセンテージは、配列アライメントを介して決定され得る。かかるアライメントは、例として、<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>、もしくはGAPプログラム(University of Iowaの数学アルゴリズム)、もしくはMyersおよびMillerの数学アルゴリズム(1989-Cabios 4:11-17)、もしくはClone Manager 9上で利用可能な、当該技術分野で知られている数種のアルゴリズムで、好ましくは、KarlinおよびAltschulの数学アルゴリズム(Karlin & Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877)で、hmmalign(HMMER package,<http://hmmer.wustl.edu/>)で、またはCLUSTALアルゴリズム(Thompson,J.D.,Higgins,D.G. & Gibson,T.J.(1994)Nucleic Acids Res.22,4673-80)で実行され得る。使用される好ましいパラメータは、<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>上で設定されているとおりの初期設定パラメータである。

10

【0170】

配列同一性(配列マッチング)のグレードは、例として、BLAST、BLAT、またはBlast Z(もしくはBlastX)を使用して算出されてもよい。同様のアルゴリズムは、Altschul et al(1990)J.Mol.Biol.215,403-410のBLASTNおよびBLASTPのプログラム中へ組み込まれている。BLASTポリヌクレオチド検索が、BLASTNプログラム、score=100、word length=12で実施されると、関係のあるタンパク質をコードするそれら核酸と相同のポリヌクレオチド配列が得られる。

20

【0171】

BLASTタンパク質検索が、BLASTPプログラム、score=50、word length=3で実施されると、SHCポリペプチドと相同のアミノ酸配列が得られる。比較目的でギャップのある(gapped)アライメントを得るには、Gapped BLASTが、Altschul et al(1997)Nucleic Acids Res.25,3389-3402に記載のとおり利用される。BLASTおよびGapped BLASTのプログラムを利用するとき、夫々のプログラムの初期設定パラメータが使用される。配列マッチング分析は、Shuffle-LAGAN(Brudno M.,Bioinformatics 2003b,19 Suppl 1:154-162)またはマルコフ確率場といった、確立された相同性マッピング技法によって補完されてもよい。配列同一性のパーセンテージが本出願において触れられるとき、これらのパーセンテージは、別様に具体的に指し示されない場合、より長い配列の完全長に関して算出される。

30

【0172】

具体的な態様において、2つの配列間の%同一性は、CLUSTAL O(version 1.2.4)を使用して決定される。

【0173】

態様において、「類似性」は、場合によっては、数珠状(strings of)アミノ酸配列間の一致によって決定されるとおり、かかる配列間の配列類似度(degree of sequence relatedness)を意味する。2つのアミノ酸配列間の「類似性」は、一方のポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸置換体(substitutes)を、もう一方のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。「同一性」および「類似性」は、Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,ed.,Oxford University Press,New York,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,ed.,Academic Press,New York,1993;Computer Analysis of Sequence Data,Part I,Griffin,A.M.,and Griffin,H.G.,eds.,Humana Press,New Jersey,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heine,G.,Academic Press,1987;およびSequence Analysis Primer,Gribskov,M. and Devereux,J.,eds.,M Stockton Press,New York,1991;およびCarillo,H.,and Lipman,D.,SIAM J.Applied Math.,48:1073(1988)に記載されている方法を包含するがこれらに限定されない、知られている方法によって容易に算出され得る。

40

【0174】

50

ポリペプチド配列の比較にとって好ましいパラメータは以下を包含する:アルゴリズム: Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443-453 (1970); 比較マトリックス: Hentikoff and Hentikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:10915-10919 (1992) からの BLOSSUM62; ギャップペナルティ (Gap Penalty): 12; およびギャップ長さペナルティ: 4。これらのパラメータに有用なプログラムは、WI、Madisonにある Genetics Computer Groupからの「Ogap」プログラムとして公的に利用可能である。先述のパラメータは、アミノ酸比較のための初期設定パラメータである(と同時に終端ギャップに対するペナルティはない)。

【0175】

任意に、アミノ酸類似性の程度の決定において、当業者はまた、当業者にとっては明確であろうが、所謂「保存的な」アミノ酸置換体も考慮に入れてもよい。2つのアミノ酸配列間の「類似性」は、一方のポリペプチドのアミノ酸配列およびその保存されたアミノ酸置換体(substitutes)を、もう一方のポリペプチドの配列と比較することによって決定される。本明細書に使用されるとき、「保存的な」アミノ酸置換は、類似した側鎖を有する残基の交換可能性を指す。保存的置換のためのアミノ酸残基のクラスの例は下の表に与えられる。

【0176】

表4: アミノ酸残基のクラス

【表4】

酸性残基	Asp (D) および Glu (E)
塩基性残基	Lys (K), Arg (R), および His (H)
親水性非荷電性残基	Ser (S), Thr (T), Asn (N), および Gln (Q)
脂肪族非荷電性残基	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), および Ile (I)
無極性非荷電性残基	Cys (C), Met (M), および Pro (P)
芳香族残基	Phe (F), Tyr (Y), および Trp (W)

【0177】

表5: 代替の保存アミノ酸残基置換クラス

【表5】

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

【0178】

表6: アミノ酸残基の代替の物理的および機能的な分類

【表6】

アルコール基含有残基	S および T
脂肪族残基	I, L, V, および M
シクロアルケニル随伴残基	F, H, W, および Y
疎水性残基	A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, および Y
負電荷残基	D および E
極性残基	C, D, E, H, K, N, Q, R, S, および T
正電荷残基	H, K, および R
小さい残基	A, C, D, G, N, P, S, T, および V
極めて小さい残基	A, G, および S
ターン形成に関与する残基	A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, および T
フレキシブルな残基	Q, T, K, S, G, P, D, E, および R

【0179】

例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群は、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン

、およびイソロイシンである；脂肪族-ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群は、セリンおよびトレオニンである；アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群は、アスパラギンおよびグルタミンである；芳香族側鎖を有するアミノ酸の群は、フェニルアラニン、チロシン、およびトリプトファンである；塩基性側鎖を有するアミノ酸の群は、リシン、アルギニン、およびヒスチジンである；ならびに硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群は、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸置換の群は次である：バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リシン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミン。本明細書に開示のアミノ酸配列の置換バリエーションは、開示された配列において少なくとも1つの残基が除去され、その場所に異なる残基が挿入されているバリエーションである。好ましくは、アミノ酸変化は保存的である。天然に存在するアミノ酸の各々にとって好ましい保存的置換は以下のとおりである：Ala→Ser；Arg→Lys；Asn→GlnまたはHis；Asp→Glu；Cys→SerまたはAla；Gln→Asn；Glu→Asp；Gly→Pro；His→AsnまたはGln；Ile→LeuまたはVal；Lys→Arg；GlnまたはGlu；Met→LeuまたはIle；Phe→Met、Leu、またはTyr；Ser→Thr；Thr→Ser；Trp→Tyr；Tyr→TrpまたはPhe；およびVal→IleまたはLeu。

10

【0180】

本明細書に記載の方法に使用されてもよい特定のSHC/HAC酵素および酵素バリエーションは、さらに下に記載される。

【0181】

新しい突然変異をもつSHC/HACのバリエーション

20

驚くべきことに、Aac SHC/HAC酵素(配列番号1)に、または該Aac SHC/HAC酵素のバリエーション(配列番号2もしくは配列番号3)に由来するか、あるいは本明細書に同定されるとおりの他の野生型SHC(表2、3、または16において同定されるものなど、とくに配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310によって表されるものなど)に由来するか、あるいは他のバリエーション(配列番号47、48、49、50、51、52、53、54)ならびにW02016/170099の表14および/またはW02021/110848の表6に開示されているもの(下に提供されるとおり、配列番号361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383によって表されるとおりのもの)に由来する、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されるとおりであって、かつ実験パートにおいてさらに実証されるとおり、改良/最適化された活性/生物活性を

30

40

50

呈する。

【0182】

配列番号3は、アミノ酸改変(置換)M132R、A224V、およびI432Tをもつ配列番号1に対応する。

配列番号2は、アミノ酸改変(置換)M132R、A224V、I432T、A557T、およびR613Sをもつ配列番号1に対応する。

【0183】

態様において、配列番号2または3に由来する新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、それらを配列番号1と比較したとき、依然としてアミノ酸改変(置換)を含む。これらのアミノ酸改変は以下のとおりである：

- 配列番号3に由来するバリエーションは、配列番号1と比較して、以下のアミノ酸改変(置換)：M132R、A224V、およびI432Tを含んでいてもよく、
- 配列番号2に由来するバリエーションは、配列番号1と比較して、以下のアミノ酸改変(置換)：M132R、A224V、I432T、A557T、およびR613Sを含んでいてもよく、
- 配列番号2に由来するバリエーションは、配列番号1と比較して、以下のアミノ酸改変(置換)：M132RおよびI432Tを含んでいてもよく、
- 配列番号2に由来するバリエーションは、配列番号1と比較して、以下のアミノ酸改変(置換)：M132RおよびI432T、A557TおよびR613Sを含んでいてもよい。

【0184】

WO2016/170099の表14に列挙される配列のいずれか1つに由来するバリエーションは、配列番号5、7、9、11、13、15、17、19、171、23、25、27、29、31、33、35、37、または39(夫々、本出願の配列番号361～368、378、3、369～377に対応する)を包含するが、これらに限定されない(下の表7および実験パートの最後にて開示されている配列を見よ)。

【0185】

WO2021/110848の表6に列挙される配列のいずれか1つに由来するバリエーションは、配列番号5、17、18、2、または4を包含するがこれらに限定されない(下の表8および実験パートの最後にて開示されている配列を見よ)。

【0186】

表7：WO 2016/170099の表14に対応：AacSHC誘導体アミノ酸およびヌクレオチドの配列番号

【表7】

アミノ酸 配列番号	突然変異 (単数または複数)	SHC誘導体 名称	ヌクレオチド 配列番号
配列番号 5	T77A		6
配列番号 7	I92V		8
配列番号 9	F129L		10
配列番号 11	M132R		12
配列番号 13	A224V		14
配列番号 15	I432T		16
配列番号 17	Q579H		18
配列番号 19	F601Y		20
配列番号 171	F605W		170
配列番号 21	M132R + A224V + I432T	215G2	22
配列番号 23	M132R + I432T	SHC26	24
配列番号 25	F601Y	SHC3	26
配列番号 27	T77A + I92V + F129L	111C8	28
配列番号 29	Q579H + F601Y	101A10	30
配列番号 31	F129L	SHC10	32
配列番号 33	F129L + F601Y	SHC30	34
配列番号 35	F129L + M132R + I432T	SHC31	36
配列番号 37	M132R + I432T + F601Y	SHC32	38
配列番号 39	F129L + M132R + I432T + F601Y	SHC33	40

10

20

30

40

50

【0187】

表8:W02021/110848の表6に対応。選択された新しいSHCバリエント酵素における突然変異。

【表8】

SHC バリエント	Y81H	T90A	A172T	M277K	H431L	A557T	R613S
110B8 (配列番号 5)	+				+	+	
90C7 (配列番号 17)		+					+
115A7 (配列番号 18)			+	+			
SHC 49 (配列番号 2)					+	+	
SHC 65 (配列番号 3)						+	+
SHC 66 (配列番号 4)	+					+	+

10

注記:これらの突然変異は、215G2 SHC中に存在する突然変異:M132R、A224V、およびI432Tに加えて、存在するように見える表8の配列番号2、3、4、5、17、および18は、配列番号379、2、380、381、382、および383に対応する。

【0188】

上の表7および8において同定される配列は、配列表における、および実験パートの最後にて指し示されるとおりの、配列番号361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383のいずれかによって表される。

20

【0189】

ある態様において、SHC/HAC酵素バリエントは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と比較して、約30と等しいかまたは約30未満のアミノ酸改変を有していてもよい。例えば、SHC/HAC酵素バリエントは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、7

30

40

50

3、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と比較して、約25と等しいかもしくは約25未満の、または約20と等しいかもしくは約20未満の、または約15と等しいかもしくは約15未満の、または約10と等しいかもしくは約10未満の、または約9と等しいかもしくは約9未満の、または約8と等しいかもしくは約8未満の、または約7と等しいかもしくは約7未満の、または約6と等しいかもしくは約6未満のアミノ酸改変を有していてもよい。例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と比較して、少なくとも約5または少なくとも約6のアミノ酸改変を有していてもよい。アミノ酸改変は、例えば、上に記載のとおり挿入、欠失、および/または置換であってもよい。

10

20

30

40

50

【0190】

ある態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と比較した、SHC/HAC酵素バリエーションにおける唯一のアミノ酸改変は、置換である(すなわち、挿入も欠失もない)。

10

20

【0191】

アミノ酸改変は、参照配列と比べて定義される。参照配列と比べたアミノ酸改変は、バリエーション配列のアミノ酸配列が参照配列とは異なることを意味する。

【0192】

参照配列およびバリエーション配列におけるアミノ酸は、数字が割り当てられもよく、ここで付番はポリペプチドのN末端でのアミノ酸から始まる(すなわち、ポリペプチドのN末端でのアミノ酸は1と付番され、次のアミノ酸は2と付番される等々)。参照配列の「位置」は、参照配列中の特定付番のアミノ酸によって同定されたとおり、参照配列中に存在する特定のアミノ酸残基を指す。バリエーション配列の「位置」は、バリエーション配列中の特定付番のアミノ酸によって同定されたとおり、バリエーション配列中に存在する特定のアミノ酸残基を指す。

30

【0193】

バリエーション配列は、参照配列と比較して欠失または挿入を包含していてもよいので、バリエーション配列中のアミノ酸は、参照配列中の同じアミノ酸とは異なって付番されていてもよい。一例として、あるアミノ酸が、配列番号1のアミノ酸131と132との間に挿入された場合、そのあるアミノ酸は参照配列中付番132を保持する一方、その挿入の次のアミノ酸は、バリエーション配列中付番133を有するであろう。この例において、参照配列の位置132に対応するバリエーション配列の位置は、位置133である。したがって、参照配列から保持されているバリエーション配列中のアミノ酸は、参照配列の「対応する位置」を指すことによって定義されてもよい。換言すれば、バリエーション配列中の「位置」は、参照配列中の「対応する位置」を指すことによって定義されてもよい。とりわけ、参照配列と比較したバリエーション配列中の置換は、参照配列中いずれの挿入および/または欠失があるにもかかわらず、参照配列の「対応する位置」を指すことによって定義されてもよい。参照配列のアミノ酸が欠失されている場合、バリエーション配列中に「対応する位置」は存在しない。参照配列と比較して挿入も欠失もない(すなわち、置換しか存在しない)場合、参照配列の

40

50

「対応する位置」は、バリエーション配列中の位置と同じであろう。

【0194】

例えば、配列番号1によって表されるAacSHCにおける位置169は、ZmoSHC1(配列番号13または14)における位置222、ZmoSHC2(配列番号15)における位置177、TelSHC(配列番号23)における位置172、およびScoSH1(配列番号32)における位置196に対応する。

【0195】

例えば、配列番号1によって表されるAacSHCにおける位置306は、ZmoSHC1(配列番号13または14)における位置368、ZmoSHC2(配列番号15)における位置321、TelSHC(配列番号23)における位置311、およびScoSH1(配列番号32)における位置335に対応する。

【0196】

例えば、配列番号1によって表されるAacSHCにおける位置600は、ZmoSHC1(配列番号13または14)における位置667、ZmoSHC2(配列番号15)における位置619、TelSHC(配列番号23)における位置609、およびScoSH1(配列番号32)における位置629に対応する。

【0197】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有するが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149

10

20

30

40

50

、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と比べて、配列番号1、2、3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは野生型SHC/HACのアミノ酸配列において配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、アミノ酸改変を有する。

10

【0198】

SHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と比べて、配列番号1、2、3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは野生型SHC/HACのアミノ酸配列において配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、アミノ酸改変を有する。

20

30

40

【0199】

態様において、SHC/HAC酵素または酵素バリエーション(またタイプ1バリエーションとも指名される)は、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、

50

配列番号34、配列番号47、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52、配列番号53、配列番号54、および/または配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383と、少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性または類似性をもつアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、または3に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置W169、A306、および/またはG600に対応する、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、

10

20

30

40

50

242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有する。

【0200】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションは、配列番号1、配列番号2、配列番号3と、少なくとも30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは100%の同一性または類似性をもつアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3に対し、配列番号1、2、3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にてアミノ酸改変を有する。

【0201】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ2バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3の位置W169に対応する位置にて、または配列番号1、2、3のW169に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、9

10

20

30

40

50

5、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、47、48、49、50、51、52、53、もしくは54としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有する。

10

【0202】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

20

【0203】

態様において、SHC/HAC酵素バリエント(またタイプ3バリエントとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379

30

40

50

、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3の位置W169およびG600Mに対応する位置にて、または配列番号1、2、3のW169およびG600Mに対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有する。

【0204】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0205】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ4バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、

205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、およびG600に対応する位置にて、または配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、およびG600に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有する。

【0206】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0207】

上に同定されるSHC/AHC酵素バリエーションにおける改変された位置のすべての組み合わせが、本開示によって網羅される:(配列番号1を参照するとき)

- W169
- W169、A306
- W169、A306、G600

- W169、G600
- A306、G600
- A306
- G600。

【0208】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169に対応する位置での新しいアミノ酸(X)は、G、A、もしくはV、またはそれらの機能的同等物であってもよい。Gの機能的同等物は、Pである。AとVとは、機能的同等物である。M、L、およびIもまた、AおよびVの機能的同等物である。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169での、あるいは配列番号1、2、もしくは3の169に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での、好ましい新しいアミノ酸は、G、A、またはVである。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169での、あるいは配列番号1、2、もしくは3の169に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、19

10

20

30

40

50

4、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での、最も好ましい新しいアミノ酸は、Gである。

10

【0209】

例えば、配列番号1によって表されるAacSHCにおける位置169は、ZmoSHC1(配列番号13)における位置222、ZmoSHC2(配列番号15)における位置177、TelSHC(配列番号23)における位置172、およびScoSH1(配列番号32)における位置196に対応する。

【0210】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306に対応する位置での新しいアミノ酸(X)は、Vまたはその機能的同等物であってもよい。Vの機能的同等物は、A、M、L、およびIである。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54の位置306での、あるいは配列番号1、2、もしくは3の306に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での、好ましい新しいアミノ酸は、Vである。

20

30

40

【0211】

例えば、配列番号1によって表されるAacSHCにおける位置306は、ZmoSHC1(配列番号13)における位置368、ZmoSHC2(配列番号15)における位置321、TelSHC(配列番号23)における位置311、およびScoSH1(配列番号32)における位置335に対応する。

【0212】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600に対応する位置での新しい

50

アミノ酸(X)は、A、V、L、I、もしくはM、またはそれらの機能的同等物であってもよい。これらすべてのアミノ酸は、機能的同等物である。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54の位置600での、または配列番号1、2、3の600に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での、好ましい新しいアミノ酸は、A、V、L、I、またはMである。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600での、あるいは配列番号1、2、もしくは3の600に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での、最も好ましい新しいアミノ酸は、Mである。

【0213】

10

20

30

40

50

例えば、配列番号1によって表されるAacSHCにおける位置600は、ZmoSHC1(配列番号13)における位置667、ZmoSHC2(配列番号15)における位置619、TelSHC(配列番号23)における位置609、およびScoSH1(配列番号32)における位置629に対応する。

【0214】

表9:4つの異なる野生型SHC/HACにおける3つの好ましい突然変異したアミノ酸(AA)の位置

【表9】

AacSHC中の AA位置	以下における対応するAA位置			
	ZmoSHC1	ZmoSHC2	TelSHC	ScoSHC
169	222	177	172	196
306	368	321	311	335
600	667	619	609	629

10

【0215】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ5バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、1

20

30

40

50

54、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

- 位置169でのWは、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、
- 位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または
- 位置600でのGは、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

10

【0216】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

20

【0217】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ6バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、

30

40

50

364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169に対応する位置にて、または配列番号1、2、もしくは3のW169に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置169にてGによって置き換えられるWである。

10

20

30

【0218】

態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられる。

【0219】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0220】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ7バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、1

40

50

60、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3の位置W169およびG600Mに対応する位置にて、または配列番号1、2、もしくは3のW169およびG600Mに対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および
- 位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0221】

態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられ、かつ配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、

365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0222】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

10

【0223】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3の位置W169およびA306に対応する位置にて、または配列番号1、2、もしくは3のW169およびA306に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、1

20

30

40

50

80、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

10

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および
- 位置306でのAは、Vによって置き換えられる。

【0224】

態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vによって置き換えられる。

20

【0225】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

30

【0226】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ8バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、24

40

50

9、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも約30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3の位置W169、A306、およびG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、およびG600に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、
- 位置306でのAは、Vによって置き換えられ、および
- 位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0227】

態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gによって置き換えられる。

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vによって置き換えられ、および

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、

10

20

30

40

50

373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0228】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

10

【0229】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置W169およびG600に対応する位置にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

20

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および
- 位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0230】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0231】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置W169およびA306に対応する位置にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

30

40

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および
- 位置306でのAは、Vによって置き換えられる。

【0232】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0233】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ9バリエーションとも指名される)は

50

、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

10

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、
- 位置306でのAは、Vによって置き換えられ、および
- 位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

【0234】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0235】

20

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、305、もしくは306と、少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、305、または306に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、または54の位置W169に対応する位置にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置169にてGによって置き換えられるWである。

30

【0236】

態様において、配列番号2、3、47、48、49、50、51、53、54、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、305、もしくは306と、少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するSHC/HAC酵素バリエーション(タイプ10バリエーション)の各々は、依然として同じ突然変異(単数または複数)を有するが、これは配列番号1とは異なる。これら突然変異の各々は既に、少なくとも「配列の概要」と題するセクションにおいて本明細書に定義されている。この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

40

【0237】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC1 P1バリエーション、配列番号312)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号13もしくは14と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号13に対し、配列番号13または14の位置W222にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置222にてGによって置き換えられるWである。

【0238】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号312と少なくとも70%を有

50

し、かつ依然としてW222Gを有する、アミノ酸配列によって表される。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0239】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC1 P2バリエーション、配列番号353)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号13と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号13に対し、配列番号13の位置W222およびG667にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置222にてGによって置き換えられるW、および位置667にてMによって置き換えられるGである。

10

【0240】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0241】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC1 P2バリエーション、配列番号353)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号13と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号13に対し、配列番号13の位置W222およびA368にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置222にてGによって置き換えられるW、および位置368にてVによって置き換えられるAである。

20

【0242】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0243】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC1 P3バリエーション、配列番号354)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号13と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号13に対し、配列番号13の位置W222、A368、およびG667にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置222にてGによって置き換えられるW、位置368にてVによって置き換えられるA、および位置667にてMによって置き換えられるGである。

30

【0244】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

40

【0245】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC1 P2バリエーション、配列番号313)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号15と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号15に対し、配列番号15の位置W177にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置177にてGによって置き換えられるWである。

【0246】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号313と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW177Gを有する、アミノ酸配列によって表される。

50

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0247】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC2 P2バリエーション、配列番号355)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号15と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号15に対し、配列番号15の位置W177およびG619にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置177にてGによって置き換えられるW、および位置619にてMによって置き換えられるGである。

10

【0248】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号313または355と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW177GおよびG619Mを有する、アミノ酸配列によって表される。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0249】

20

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号15に対し、配列番号15の位置W177および321にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置177にてGによって置き換えられるW、および位置321にてVによって置き換えられるAである。

【0250】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号313と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW177GおよびA321Vを有する、アミノ酸配列によって表される。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

30

【0251】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ZmoSHC2 P3バリエーション、配列番号356)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号15と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号15に対し、配列番号15の位置W177、A321、およびG619にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置177にてGによって置き換えられるW、位置321にてVによって置き換えられるA、および位置619にてMによって置き換えられるGである。

【0252】

40

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号313と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW177G、A321V およびG619Mを有する、アミノ酸配列によって表される。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0253】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(Tel SHCバリエーションP1、配列番号304)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号23と少なくとも70.0%の

50

同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号23に対し、配列番号23の位置W172にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置172にてGによって置き換えられるWである。

【0254】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号304と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW172Gを有する、アミノ酸配列によって表される。

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号302と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW172Gを有する、アミノ酸配列によって表される。

【0255】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

10

【0256】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(Tel SHCバリエーションP2、配列番号359)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号23と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号23に対し、配列番号23の位置W172およびG609にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置172にてGによって置き換えられるW、および位置609にてMによって置き換えられるGである。

20

【0257】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号359と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW172GおよびG609Mを有する、アミノ酸配列によって表される。この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0258】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号23に対し、配列番号23の位置W172およびA311にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置172にてGによって置き換えられるW、および位置311にてVによって置き換えられるAである。

30

【0259】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号360と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW172GおよびA311Vを有する、アミノ酸配列によって表される。この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

40

【0260】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(Tel SHCバリエーションP3、配列番号360)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号23と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号23に対し、配列番号23の位置W172、A311、およびG609にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置172にてGによって置き換えられるW、位置311にてVによって置き換えられるA、および位置609にてMによって置き換えられるGである。

【0261】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号360と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW172G、A311V、およびG609Mを有する、アミノ酸配列によっ

50

て表される。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0262】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ScoSHC1 P1バリエーション、配列番号311)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号32と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号32に対し、配列番号32の位置W196にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置196にてGによって置き換えられるWである。

10

【0263】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号311と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW196Gを有する、アミノ酸配列によって表される。

【0264】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ScoSHC1 P2バリエーション、配列番号357)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号32と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号32に対し、配列番号32の位置W196およびG629にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置196にてGによって置き換えられるW、および位置629にてMによって置き換えられるGである。

20

【0265】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号311と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW196GおよびG629Mを有する、アミノ酸配列によって表される。

【0266】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号32に対し、配列番号32の位置W196およびA335にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置196にてGによって置き換えられるW、および位置335にてVによって置き換えられるAである。

30

【0267】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号311と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW196GおよびA335Vを有する、アミノ酸配列によって表される。この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0268】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(ScoSHC1 P3バリエーション、配列番号358)(またタイプ10バリエーションとも指名される)は、配列番号32と少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号32に対し、配列番号32の位置W196、A335、およびG629にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置196にてGによって置き換えられるW、位置335にてVによって置き換えられるA、および位置629にてMによって置き換えられるGである。

40

【0269】

好ましい態様において、この酵素バリエーションは、配列番号311と少なくとも70%を有し、かつ依然としてW196G、A335V、およびG629Mを有する、アミノ酸配列によって表される。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%

50

、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0270】

好ましい態様において、酵素バリエーションは以下のとおりである：

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号7、8、9、または386と少なくとも90.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、ならびに以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号10、11、12、または385と少なくとも90.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：M132R、A224V、I432Tを有し、ならびに以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W172G、A311V、およびG609Mの少なくとも1つを有し(Tel SHC/HACバリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W196G、A335V、およびG629Mを有し(Scd SHC/HACバリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W222G、A368V、およびG667Mの少なくとも1つを有し(Zmo SHC1バリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W177G、A321V、およびG619Mの少なくとも1つを有し(Zmo SHC2バリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ少なくとも以下の突然変異：W169G、G600M、M132R、およびI432Tを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1と少なくとも90.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169G、G600M、M132R、およびI432Tを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1と少なくとも95.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169G、G600M、M132R、およびI432Tを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1と少なくとも96.0%、97.0%、99.0%、99.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169G、G600M、M132R、およびI432Tを有する。

【0271】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0272】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ11バリエーションとも指名される)は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と、少なくとも70.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、

49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、もしくは54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置W169およびG600Mに対応する位置にてアミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は次である：

- 位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および
- 位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0273】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ12バリエーションとも指名される)は、配列番号1と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1に対し、以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する。

【0274】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ13バリエーションとも指名される)は、配列番号4と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1に対し、少なくとも以下の突然変異:W169Gを有する。

【0275】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ14バリエーションとも指名される)は、配列番号5と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1に対し、少なくとも以下の突然変異:W169GおよびG600Mを有する。

【0276】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1に対し、少なくとも以下の突然変異:W169GおよびA306Vを有する。

【0277】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ15バリエーションとも指名される)は、配列番号6と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1に対し、少なくとも以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mを有する。

【0278】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0279】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ16バリエーションとも指名される)は、配列番号3と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432Tを有し、かつ配列番号3に対し、以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する。

【0280】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ17バリエーションとも指名される)は、配列番号10と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432Tを有し、かつ配列番号3に対し、以下の突然変異:W169Gを有する。

【0281】

10

20

30

40

50

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ18バリエーションとも指名される)は、配列番号11と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432Tを有し、かつ配列番号3に対し、以下の突然変異:W169GおよびG600Mを有する。

【0282】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ32バリエーションとも指名される)は、配列番号385と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432Tを有し、かつ配列番号3に対し、以下の突然変異:W169GおよびA306Vを有する。

【0283】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ19バリエーションとも指名される)は、配列番号12と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432Tを有し、かつ配列番号3に対し、以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mを有する。

【0284】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0285】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ20バリエーションとも指名される)は、配列番号2と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、かつ配列番号2に対し、以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する。

【0286】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ21バリエーションとも指名される)は、配列番号7と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、かつ配列番号2に対し、以下の突然変異:W169Gを有する。

【0287】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ22バリエーションとも指名される)は、配列番号8と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、かつ配列番号2に対し、以下の突然変異:W169GおよびG600Mを有する。

【0288】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ33バリエーションとも指名される)は、配列番号386と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、かつ配列番号2に対し、以下の突然変異:W169GおよびA306Vを有する。

【0289】

態様において、SHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ23バリエーションとも指名される)は、配列番号9と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、配列番号1に対し、以下の突然変異M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、かつ配列番号2に対し、以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mを有する。

【0290】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

10

20

30

40

50

【0291】

態様において、SHC/AHC酵素バリエーション(またタイプ34バリエーションとも指名される)は、配列番号1~12、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47~54、55~296、301~313、315~353、354~383と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ここで配列番号1の位置169でのまたは配列番号1の位置169に対応するWは、Gによって置き換えられる;ここで配列番号1、2、もしくは3の位置306でのまたは配列番号1、2、もしくは3の位置306に対応するAは、Vによって置き換えられる;および/またはここで配列番号1、2、もしくは3の位置600でのまたは600に対応するGは、Mによって置き換えられる。

10

【0292】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0293】

態様において、SHC/AHC酵素バリエーション(またタイプ24バリエーションとも指名される)は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、304、311、312、313、305、306、302、359、357、353、355、360、358、354、356を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなる、アミノ酸配列を有する。

20

【0294】

態様において、SHC/AHC酵素バリエーション(またタイプ25バリエーションとも指名される)は、配列番号315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、352を含むか、それからなるか、または本質的にそれからなる、アミノ酸配列を有する。

【0295】

態様において、本明細書に定義されるSHC/HAC酵素バリエーションの各々(タイプ1~34バリエーション)は、以下の追加のアミノ酸改変を有していてもよく、ここで配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置168に対応する位置での(新しい)アミノ酸(X)は、Sまたはその機能的同等物であってもよい。Sの機能的同等物は、C、T、N、またはQである。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置168での、あるいは配列番号1、2、もしくは3の168に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、1

30

40

50

81、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での、好ましい新しいアミノ酸は、Sである。

10

【0296】

好ましい態様において、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、かつ

- 配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54に対し、配列番号1、2、3の位置W169に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、3のW169に対して配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸改変を有し、かかるアミノ酸改変は、位置169にてGによって置き換えられるWであり、ならびに

20

30

40

- 配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383に対し位置168にて、配列番号1、2、3のS168に対応する位置にて、または配列番号1、2、3のS168に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99

50

、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて、アミノ酸Sを有する。

10

【0297】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

20

【0298】

態様において、いずれかのSHC/HAC酵素バリエントは、配列番号1を有する野生型Aa c SHC/HAC、または配列番号1に由来し、かつ配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383を有するいずれかのバリエントを参照することによって、以下の保存されたアミノ酸L22、Q26、G30、W32、A44、L48、Q72、G76、W78、Y95、L98、G102、A113、I117、G121、G122、F129、T130、L134、A135、G138、W142、P146、W169、A170、R171、F217、D222、R237、I261、P263、P281、S309、P310、W312、D313、T314、A320、W339、Q344、G349、D350、W351、G361、G362、A364、F365、N369、Y372、P373、D374、D376、D377、W406、Q411、G415、A419、P433、D436、D442、P443、D447、V448、Q479、G483、W485、G487、R488、W489、G490、N492、Y495、G496、T497、L504、W522、Q527、G531、G532、W533、G534、E535、S539、Y540、G547、T552、T556、W558、A559、A565、L581、Q585、G589、W591、G600、F601、P602、F605、Y609、Y612、F616、P617、A620、およびR623の少なくとも1つを含んでいてもよい。このバリエントはまた、本明細書に定義されるとおりのいずれかの野生型SHC/HAC酵素(例として、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、

30

40

50

143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310)にも由来してもよく、ここで対応する位置は、配列番号1について上に同定されたものに対応して同定される。このバリエーションは、本明細書に以前定義されたいずれのバリエーションタイプにも由来してもよい。

10

20

30

40

50

【0299】

したがって、EEHを(-)-アンブロックスへ酵素的に変換することによって(-)-アンブロックスを作製するためのプロセスが本明細書に提供される。E,E-ビスホモファルネソールをアンブラオキシドへ酵素的に変換することによってアンブラオキシドを作製するためのプロセスもまた、本明細書に提供される。これらのプロセスは、本明細書に記載のいずれかのSHC/HAC酵素バリエーション(とくにタイプ1~25の)を使用してもよい。

【0300】

ポリペプチド配列またはヌクレオチド配列に関する「パーセント(%)同一性」は夫々、配列をアラインし、かつ、最大のパーセント配列同一性を獲得するために必要ならばギャップを導入した後の、参照配列中のアミノ酸またはヌクレオチドと同一である候補配列中のアミノ酸またはヌクレオチドのパーセンテージとして定義されるが、配列同一性の一環としていずれの保存的置換も考慮しない。パーセント配列同一性を決定する目的のためのアライメントは、当該技術分野における技能の範囲内にある様々な手法で、実例として、公的に利用可能なコンピュータソフトウェアを使用し達成され得る。当業者は、比較される配列の完全長にわたり最大のアライメントを達成するのに必要とされるいずれのアルゴリズムも包含する、アライメントを測定するのに適切なパラメータを決定し得る。用語「ポリペプチド」および「タンパク質」は本明細書中、互換的に使用され、長さまたは翻訳後修飾(post-translational modification)を問わず、アミノ酸のいずれかのペプチド連結鎖を意味する。

【0301】

ヌクレオチドおよびアミノ酸の配列類似性、すなわち、配列同一性のパーセンテージは、配列アライメントを介して決定され得る。かかるアライメントは、例として、<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>、もしくはGAPプログラム(University of Iowaの数学アルゴリズム)、もしくはMyersおよびMillerの数学アルゴリズム(1989-Cabios 4:11-17)上で利用可能な、当該技術分野で知られている数種のアルゴリズムで、好ましくはKarlinおよびAltschulの数学アルゴリズム(Karlin & Altschul(1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877)で、hmmalign(HMMER package,<http://hmm.wustl.edu/>)で、またはCLUSTALアルゴリズム(Thompson,J.D., Higgins,D.G. & Gibson,T.J.(1994) Nucleic Acids Res.22,4673-80)で実行され得る。使用される好ましいパラメータは、<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>上で設定されているとおりの初期設定パラメータである。

【0302】

パーセンテージ配列同一性は、例えば、BLAST、BLAT、またはBlastZ(もしくはBlastX)を使用して算出されてもよい。同様のアルゴリズムは、Altschul et al(1990) J. Mol.Biol.215,403-410のBLASTNおよびBLASTPのプログラム中へ組み込まれてい

る。BLASTポリヌクレオチド検索が、BLASTNプログラム、score=100、word length=12で実施されると、関係のあるタンパク質をコードするそれら核酸と相同のポリヌクレオチド配列が得られる。BLASTタンパク質検索が、BLASTPプログラム、score=50、word length=3で実施されると、ポリペプチドと相同のアミノ酸配列が得られる。

【0303】

比較目的でギャップのあるアライメントを得るには、Gapped BLASTが、Altschul et al(1997)Nucleic Acids Res.25,3389-3402に記載のとおり利用される。BLASTおよびGapped BLASTのプログラムを利用するとき、夫々のプログラムの初期設定パラメータが使用される。配列マッチング分析は、Shuffle-LAGAN(Brudno M.,Bioinformatics 2003b,19 Suppl 1:154-162)またはマルコフ確率場といった、確立された相同性マッピング技法によって補完されてもよい。配列同一性のパーセンテージが本出願において触れられるとき、これらのパーセンテージは、別様に具体的に指し示されない場合、より長い配列の完全長に関して算出される。

【0304】

具体的な態様において、2つの配列間の%同一性は、CLUSTAL O(version 1.2.4)を使用して決定される。

【0305】

追加のアミノ酸改変も、本明細書に開示のSHC/AHCバリエーションに存在していてもよい。態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310に対する追加のアミノ酸改変の例は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置81、431、90、172、277、37、174、601、77、92、129、579、605に対応する位置にあるか、あるいは配列番号1、2、もしくは3の81、431、90、272、177、37、174、601、77、92、129、579、605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、

10

20

30

40

50

93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にある。
【0306】

10

タイプ26のバリエーション: 態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310に対する追加のアミノ酸改変の例は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置81および/または431に対応する位置にあるか、あるいは配列番号1、2、もしくは3の81、431に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、1

20

30

40

50

09、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にある。

10

【0307】

タイプ27のバリエーション: 態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310に対する追加のアミノ酸改変の例は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置90、172、および/または277に対応する位置にあるか、あるいは配列番号1、2、もしくは3の90、272、177に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、

20

30

40

50

119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にある。

10

【0308】

タイプ28のバリエーション: 態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310に対する追加のアミノ酸改変の例は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置37、174、601に対応する位置にあるか、あるいは配列番号1、2、もしくは3の37、174、601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96

20

30

40

50

、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にある

10

【0309】

タイプ29のバリエーション: 態様において、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310に対する追加のアミノ酸改変の例は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置77、92、129、579、601、605に対応する位置にあるか、あるいは配列番号1、2、もしくは3の77、92、129、579、601、605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124

20

30

40

50

、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にある。

10

【0310】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置81に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、Y81Xであってもよい。これは、配列番号1の位置81でのアミノ酸Yの、いずれか異なるアミノ酸(X)との置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、81ではないこともある。

20

【0311】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置81に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1の位置81に対応する位置でのアミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、Y)の、塩基性アミノ酸(すなわち、His、Lys、またはArg)との置換であってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置81に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、Y)をヒスチジンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置81に対応する位置でのアミノ酸改変はY81Hである)。

30

40

【0312】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置431に対応する位置での(ま

50

たは配列番号1、2、もしくは3の431に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、H431Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置431での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Hの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、431ではないこともある。

10

【0313】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置431に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置431に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、もしくは20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、Y)を疎水性アミノ酸(すなわち、Met、Ala、Val、Leu、またはIle)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置431に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、H)をロイシンに置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置431に対応する位置でのアミノ酸改変はH431Lである)。

20

30

【0314】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置90に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の90に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、T90Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置90での(または配列番号1、2、もしくは3の90に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、2

40

50

8、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Tの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでいてもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、90ではないこともある。

【0315】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置90に対応する位置での(または配列番号1、2、3の90に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置90に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の90に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、T)を疎水性アミノ酸(すなわち、Met、Ala、Val、Leu、Ile)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置90に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の90に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、T)をアラニンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置90に対応する位置でのアミノ酸改変はT90Aである)。

【0316】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置172に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の172に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、A172Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置172での(または配列番号1、2、もしくは3の172に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Tの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでいてもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、172ではないこともある。

【0317】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、3

77、378、379、380、381、382、もしくは383の位置172に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の172に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置172に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の172に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、A)を中性の親水性アミノ酸(すなわち、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置172に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の172に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、A)をトレオニンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置172に対応する位置でのアミノ酸改変はA172Tである)。

10

20

【0318】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置277に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の277に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、M277Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置277での(または配列番号1、2、もしくは3の277に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Mの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、277ではないこともある。

30

【0319】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置277に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の81に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、37

40

50

6、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置277に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の277に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、もしくは20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、M)を塩基性アミノ酸(すなわち、His、Lys、Arg)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置277に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の277に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、M)をリシンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置277に対応する位置でのアミノ酸改変はM277Kである)。

10

20

30

40

50

【0320】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置37に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の37に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、L37Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置37での(または配列番号1、2、もしくは3の37に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Lの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでいてもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、37ではないこともある。

【0321】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置37に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の37に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置37に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の37に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、L)を中性の親水性アミノ酸(すなわち、Cys、Ser、Thr、Asn、またはGln)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、37

9、380、381、382、もしくは383の位置37に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の37に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、L)をグルタミンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置37に対応する位置でのアミノ酸改変はL37Qである)。

【0322】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置174に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の174に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、V174Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置174での(または配列番号1、2、もしくは3の277に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Vの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、174ではないこともある。

【0323】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置174に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の174に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置174に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の174に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、疎水性アミノ酸(すなわち、Met、Ala、Leu、またはIle)であってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置174に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の174に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、V)をイソロイシンに置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置174に対応する位置でのアミノ酸改変はV174Iである)。

【0324】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、36

4、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置601に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、F601Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置601での(または配列番号1、2、もしくは3の601に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Fの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでいてもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、601ではないこともある。

10

【0325】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置601に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、またはTyrであってもよい。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置601に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、芳香族酸(すなわち、Trp、Tyr、Phe)であってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置601に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の601に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、F)をチロシンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置601に対応する位置でのアミノ酸改変はF601Yである)。

20

30

40

【0326】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置77に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の77に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、T77Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、

50

382、もしくは383の位置77での(または配列番号1、2、もしくは3の77に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Tの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでいてもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、77ではないこともある。

【0327】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置77に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の77に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置77に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の77に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、T)を疎水性アミノ酸(すなわち、Met、Ala、Val、Leu、またはIle)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置77に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の77に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、T)をアラニンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置77に対応する位置でのアミノ酸改変はT77Aである)。

【0328】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置92に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の92に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、I92Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置92での(または配列番号1、2、もしくは3の92に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Iの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでいてもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、92ではないこともある。

【0329】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置92に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の92に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置92に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の92に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、I)を疎水性アミノ酸(すなわち、Met、Ala、Val、Leu、またはIle)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置92に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の92に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、I)をバリンに置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置92に対応する位置でのアミノ酸改変はI92Vである)。

10

20

【0330】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置129に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の129に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、F129Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置129での(または配列番号1、2、もしくは3の129に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Fの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、129ではないこともある。

30

40

【0331】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置129に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の129に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、またはTyrであってもよい。

50

例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置129に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の129に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、I)を疎水性アミノ酸(すなわち、Met、Ala、Val、Leu、またはIle)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置129に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の129に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、F)をロイシンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置129に対応する位置でのアミノ酸改変はF129Lである)。

10

【0332】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置579に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の579に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、Q579Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置579での(または配列番号1、2、もしくは3の579に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Qの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、579ではないこともある。

20

30

【0333】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置579に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の579に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、Tyr、またはPheであってもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置579に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の579に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、Q)を塩基性アミノ酸(すなわち、His、Lys、またはArg)へ置換してもよい。例えば、配列番号1、2、3、47、48

40

50

、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置579に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の579に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、Q)をヒスチジンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置579に対応する位置でのアミノ酸改変はQ579Hである)。

【0334】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置605に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、例えば、F605Xであってもよい。これは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置605での(または配列番号1、2、もしくは3の605に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸Fの、いずれか異なるアミノ酸(X)への置換を指す。上述のとおり、SHC/HAC酵素バリエーションは、挿入および/または欠失を加えて含んでもよいところ、新しいSHC/HAC酵素バリエーション中の新しいアミノ酸(X)の付番は、605ではないこともある。

【0335】

配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置605に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、Met、Ala、Val、Leu、Ile、Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、Asp、Glu、His、Lys、Arg、Gly、Pro、Trp、またはTyrであってもよい。配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置605に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)新しいアミノ酸(X)は、例えば、芳香族酸(すなわち、Trp、Tyr、Phe)であってもよい。例えば、配列番号1、2、もしくは3の位置605に対応する位置での(または配列番号1、2、もしくは3の605に対応する配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸改変は、配列番号1のアミノ酸(すなわち、F)をトリプトファンへ置換してもよい(すなわち、配列番号1の位置601に対応する位置でのアミノ酸改変はF605Wである)。

【0336】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、37

1、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、132、および432に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、132、および432に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

【0337】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されたとおりであって、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、601に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

10

【0338】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されたとおりであって、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、77、92、および129に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、77、92、129に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

20

【0339】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されたとおりであって、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、579、および601に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、579、および601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

30

【0340】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されたとおりであって、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、129、132、および432に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、129、132、432に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

40

【0341】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されたとおりであって、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、3

50

77、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、132、432、および601に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、132、432、601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

【0342】

例えば、SHC/HAC酵素バリエーションは、本明細書に以前定義されたとおりであって、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置169、306、600、129、132、432、および601に対応する位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、129、132、432、601に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

【0343】

新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、例えば、本明細書に以前定義されたとおりの魅力的な生物活性を呈してもよい。新しい酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、または307～310のSHC/HAC酵素と比較して、EEHの(-)-アンブロックスへの変換またはビスEEHのアンブラオキシドへの変換に対して増大した酵素活性を呈してもよい。増大した酵素活性は、例えば、EEHまたはビスEEHの増大した総変換、EEHまたはビスEEHの(例として、反応の最初の3時間における、もしくは最初の4時間における、または反応の最初の5時間における)増大した変換率、(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドの増大した産生、および副産物の減少した産生を包含する、EEHの(-)-アンブロックスへの酵素的変換またはビスEEHのアンブラオキシドへの酵素的変換のいずれの側面をも指してもよい。増大した酵素活性は、増大した産生力によって定義されてもよく、それは一般に、反応の生体触媒のグラム当たり、時間当たり、およびリットル当たりの産生された(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドの点で定義されてもよい。

【0344】

態様において、本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションは次を呈する：

参照SHC酵素(例として、野生型SHC、たとえば配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310によって表されるもの、または215G2 AacSHC、またはSHC#65、またはバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば配列番号2、3、47～54によって表されるもの)と比較して、

- EEHに対する(またはビスEEHに対する)、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- (-)-アンブロックス(またはアンブラオキシド)に対する、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 基質の具体的な異性体に対する、ホモファルネソールまたはビス-ホモファルネソール以外の基質が使用されるとき(例として、エチル-ホモファルネソール、ヒドロキシファルネシルアセトン等 - 例えば夫々W02021/110858およびW02021/209482を見よ)に増大される特異性、
- 増大される産生能、および/または
- 反応の最初の3～6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、EEH(またはビスEEH)の変換の増大された程度、ならびにEEH(またはビスEEH)の増大された変換率。

【0345】

本明細書に定義されたとおりの新しいSHC/HAC酵素バリエーション(すべてのタイプ1~34のバリエーション)は、例えば、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310のSHC/HAC野生型酵素と比較して、EEHまたはE,E-ビスホモファルネソール(ビスEEH)の増大した変換を提供してもよい。したがって、本明細書に記載のプロセスは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310のSHC/HAC野生型酵素を使用するプロセスと比較して、増大したレベルのEEHまたはビスEEH変換を有していてもよい。新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、例えば、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310のSHC/HAC野生型酵素と比較して、増大したEEHまたはビスEEH変換率を提供してもよい。したがって、本明細書に記載のプロセスは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310のSHC/HAC野生型酵素と比較して、増大したEEHまたはビスEEH変換率を有していてもよい。本明細書に定義されたとおりの新しいSHC/HAC酵素バリエーション(すべてのタイプ1~34のバリエーション)は、例えば、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310のSHC/HAC野生型酵素と比較して、反応の最初の4時間にわたり、または最初の3時間にわたり、または最初の4時間にわたり、または最初の5時間にわたり、または最初の6時間にわたり、増大したEEHまたはビスEEH変換率を提供してもよい。したがって、本明細書に記載のプロセスは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310のSHC/HAC野生型酵素と比較して、反応の最初の3時間にわたり、または最初の4時間にわたり、または最初の5時間にわたり、または最初の6時間にわたり、増大したEEHまたはビスEEH変換率を有していてもよい。これは、同じ反応条件(例として、同じpHおよび温度)下で、新しい酵素 対 参照酵素を使用するか、またはその夫々の最適化された反応条件(例として、最適化されたpHおよび温度)(それらは互いに異なってもよい)下で各酵素を使用して、査定されてもよい。

【0346】

例えば、本明細書に定義されたとおりの新しいSHC/HAC酵素バリエーション(すべてのタイプ1~34のバリエーション)は、反応の最初の6時間における、少なくとも約40%のEEHまたはビスEEH変換を提供してもよく、あるいはプロセスはこれを有していてもよい。例えば、新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、反応の最初の6時間における、少なくとも約45%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約55%、もしくは少なくとも約60%のEEHまたはビスEEH変換を提供してもよく、あるいはプロセスはこれを有していてもよい。例えば、新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、反応の最初の5時間における、少なくとも約30%のEEHまたはビスEEH変換を提供してもよく、あるいはプロセスはこれを有していてもよい。例えば、新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、反応の最初の6時間における、少なくとも約35%、もしくは少なくとも約45%、もしくは少なくとも約50%、もしくは少なくとも約55%のEEHまたはビスEEH変換を提供してもよく、あるいはプロセスはこれを有していてもよい。これは、同じ反応条件(例として、同じpHおよび温度)下で酵素(すなわち、新しいSHC/HAC酵素バリエーションと、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310の酵素と)の両方を使用することと比較したときか、またはその夫々の最適化された反応条件(例として、最適化されたpHおよび温度)(それらは互いに異なってもよい)下で各酵素を使用することと比較したときであってもよい。

【0347】

EEHの(-)-アンブロックスへの変換、またはビスEEHのアンブラオキシドへの変換、またはヒドロキシファルネシルアセトンのアンベルケタールへの変換(例えばWO2021/209482を見よ)は、例えば、上に記載のと通りの活性アッセイを使用して決定されてもよく、供給原料のグラム当たりの回収可能な産物のグラムとして算出されてもよい(これはパーセントモル変換率として算出され得る)。

【0348】

本明細書に使用されるとき、ホモファルネソール基質に係る(-)-アンブロックスへの99%/100%変換率に対する本明細書中のいずれの言及も、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを使用して(-)-アンブロックスへ変換することが可能なホモファルネソール異性体(すなわち、EEH)の99%/100%変換への言及である。

【0349】

本明細書に使用されるとき、ビスホモファルネソール基質に係るアンブラオキシドへの99%/100%変換率に対する本明細書中のいずれの言及も、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを使用してアンブラオキシドへ変換することが可能なビスホモファルネソール異性体(すなわち、ビスEEH)の99%/100%変換への言及である。

【0350】

本明細書に使用されるとき、ヒドロキシファルネシル基質に係るアンベルケタールへの99%/100%変換率に対する本明細書中のいずれの言及も、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを使用してアンベルケタールへ変換することが可能なヒドロキシファルネシル基質の99%/100%変換への言及である。WT SHC酵素またはSHC変異体を使用する、ヒドロキシファルネシルアセトン基質からのアンベルケタールの産生は、WO2021/209482に開示されており、その内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0351】

本明細書に記載の野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションの最適温度範囲は、例えば、約25℃から約55℃まで、約25℃から約50℃まで、約30℃から約55℃まで、または約30℃から約50℃までであってもよい。

【0352】

本明細書に記載の野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションにとっての最適温度は、例えば、約35℃と等しいかまたはこれより高くてもよい。例えば、野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションに最適な温度は、約40℃から約50℃まで、例えば約42℃から約48℃まで、または約44℃から約46℃まで及ぶこともある。例えば、野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションの最適温度は、約45℃であってもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションの最適温度にて実行されてもよい。

【0353】

野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションに最適なpH範囲は、約5から約7まで、約5から約6.5まで、または約5から約6までであってもよい。

【0354】

野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションに最適なpHは、例えば、約5.4と等しいかまたは約5.4より大きくてもよい。例えば、野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションに最適なpHは、約5.2から約6.0まで、例えば約5.4から約5.8まで、例えば約5.6から約5.8まで及ぶこともある。例えば、野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションの最適pHは、約5.6または約5.8であってもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションの最適pHにて実行されてもよい。

【0355】

本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスの反応媒体中のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の最適濃度は、例えば、約0.005w/w%から約0.04w/w%まで、約0.010w/w%から約0.10w/w%までであってもよい。例えば、SDSの最適濃度は、約0.040w/w%から約0.080w/w%まで、例えば、基質(例

10

20

30

40

50

として、EEHまたはビスEEH)が4g/lにて、OD_{650nm}が10までの細胞とともに使用されたとき、約0.050w/w%であってもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスの反応媒体中のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の最適濃度は、基質(例として、EEHまたはビスEEH)が125g/lにて、250g/lの細胞とともに使用されたとき、例えば、約1.0w/w%から約1.5w/w%までであってもよい。例えば、SDSの最適濃度は、約1.2w/w%から約1.4w/w%まで、例えば、基質(例として、EEHまたはビスEEH)が125g/lにて250g/lの細胞とともに使用されたとき、約1.3w/w%であってもよい。

【0356】

本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、下の例における表7に記されるとおり、使用される特定の酵素にとっての、最適温度範囲もしくは最適温度、および/または最適pH範囲もしくは最適pH、および/またはSDS最適濃度範囲もしくは最適SDS濃度にて実行されてもよい。

【0357】

上で考察されたとおり、驚くべきことに、Aac SHC/HAC酵素バリエーションに由来する、本明細書に定義されたとおりの(すべてのタイプ1~34の)SHC/HAC酵素バリエーションは、EEHの(-)-アンブロックスへの変換への、およびビスEEHのアンブラオキシドへの変換への改善された酵素活性などの、改善された生物活性を呈することが見出された。新しいSHC/HAC酵素バリエーションは、215G2 SHC/HAC(配列番号3)またはSHC #65(配列番号2)酵素バリエーションに既に存在するアミノ酸置換に加えて、少なくとも1個、2個、または3個のアミノ酸改変を有する。

【0358】

追加のSHC/HAC酵素バリエーション(タイプ29のバリエーション)は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、および613に対応する位置にて(または配列番号1、2、3の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、613に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、アミノ酸の改変(例として、置換)を有していてもよい。

【0359】

とりわけ、他の非Aac種に由来するが、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、および613にて(または配列番号1、2、3の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、613に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)同定された新しいアミノ酸改変の1以上を有するSHC/HAC酵素バリエーションもまた、EEHの(-)-アンブロックスへの変換またはビスEEHのアンブラオキシドへの変換に対して酵素活性を提供するであろうことが予想される。とりわけ、ZmoSHC1、ZmoSHC2、BjpSHC、GmoSHC、TelSHC、ApaSHC1、BmeSHC、SalSHC、またはApaSHCAに由来し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、および613にて(または配列番号1、2、3の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、613に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)同定された新しいアミノ酸改変の1以上を有する、酵素バリエーションもまた、EEHの(-)-アンブロックスへの変換またはビスEEHのアンブラオキシドへの変換に対して酵素活性を提供するであろうことが予想される。

【0360】

したがって、EEHを(-)-アンブロックスへ酵素的に変換することによって(-)-アンブロ

10

20

30

40

50

ックスを作製するためのプロセスが本明細書に提供される。E,E-ビスホモファルネソールをアンブラオキシドへ酵素的に変換することによってアンブラオキシドを作製するためのプロセスもまた、本明細書に提供される。これらのプロセスは、本明細書に記載のいずれかのSHC/HAC酵素バリエーションを使用してもよい。

【0361】

加えて、野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列と少なくとも約70.0%の同一性を有するSHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ30のバリエーションとも指名される)が本明細書に提供されるが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、野生型SHC/HAC酵素と比べて、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、および613に対応する位置から選択される位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、613に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、1以上のアミノ酸改変を有する。

10

【0362】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

20

【0363】

とりわけ、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスが本明細書に提供されるが、プロセスは、本明細書に定義されるとおりのSHC/HACバリエーションを使用し、EEHまたはEEHを含む混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含む。本明細書に定義されるすべてのSHC/AHCバリエーション(すべてのタイプ1~34)は、かかるプロセスにおいて使用されてもよい。

30

【0364】

とりわけ、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスが本明細書に提供されるが、プロセスは、野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列と少なくとも約70.0%の同一性を有するSHC/HACバリエーションを使用して、ビスEEHまたはビスEEHを含む混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、野生型SHC/HAC酵素と比べて、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、および613に対応する位置から選択される位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、81、90、172、277、431、557、613に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、1以上のアミノ酸改変を有する。

40

【0365】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%

50

、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0366】

加えて、野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列と少なくとも約70.0%の同一性を有するSHC/HAC酵素バリエーション(またタイプ31のバリエーションとも指名される)が本明細書に提供されるが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、野生型SHC/HAC酵素と比べて、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、77、92、129、579、601、605に対応する位置から選択される位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、77、92、129、579、601、605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、および/または34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、1以上のアミノ酸改変を有する。

10

【0367】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

20

【0368】

とりわけ、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスが本明細書に提供されるが、プロセスは、野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列と少なくとも約70.0%の同一性を有するSHC/HACバリエーションを使用して、ビスEEHまたはビスEEHを含む混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、野生型SHC/HAC酵素と比べて、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54の位置169、306、600、77、92、129、579、601、605に対応する位置から選択される位置にて(または配列番号1、2、もしくは3の位置169、306、600、77、92、129、579、601、605に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、および/または34、55~296、307~310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて)、1以上のアミノ酸改変を有する。

30

【0369】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

40

【0370】

本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションのタイプ(タイプ1~34)の各々において、所定の位置を置換するアミノ酸の同一性は既に、本明細書の以前に開示されており、よってこれらタイプの各々は、改変されたアミノ酸を置換するアミノ酸の特定の同一性によってさらに定義されてもよい。

【0371】

その上、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、および/または54のW169、A306、およびG600を置換する(あるいは配列番号1、2、または3の169、306、600に対応する、配列番号13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23

50

、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55～296、307～310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置での)アミノ酸の同一性は既に、本明細書に開示されている。置換するアミノ酸の、これらの鍵となる特定の位置および同一性を、下に繰り返す。

- 位置169でのWは、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、

- 位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

- 位置600でのGは、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置600でのGは、Mによって置き換えられる。

加えて、態様において、位置168でのアミノ酸残基が、大きなアミノ酸側鎖(例として、チロシン(Q))を有する場合、これは、より小さな側鎖(例として、セリン)をもつアミノ酸残基によって置き換えられる。

【0372】

別の態様において、位置168でのアミノ酸残基がセリン(S)残基である場合、これは保持されるはずである(WT AacSHCおよびWT TelSHCに見られるとおり)。

【0373】

表10:SHC/HACの活性部位にて位置付けられるアミノ酸の保存された位置(Aac SHC/HACに基づく)。保存された位置は、5つの異なるWT SHC酵素のアミノ酸位置169、261、312、365、489、600、609、および612に見られ得る。水素結合ポケットにおける相違が、ZmoSHC1、ZmoSHC2、およびScoSHCにおいてアミノ酸位置168のQ、Y、およびCに見られ得る。

【表10】

AacSHC との配列同一性	0	45.8	38.3	44.2	51.0
AacSHC に基づく活性部位アミノ酸位置	AacSHC	ZmoSHC1	ZmoSHC2	TelSHC	ScoSHC
36	L	V	L	L	L
168	S	Q	Y	S	C
169	W	W	W	W	W
261	I	I	I	I	I
306	A	A	P	P	A
307	S	T	C	C	C
312	W	W	W	W	W
365	F	F	F	F	F
366	Q	E	Q	E	E
420	Y	F	F	F	F
489	W	W	W	W	W
600	G	G	G	G	G
607	L	L	L	L	I
609	Y	Y	Y	Y	Y
612	Y	Y	Y	Y	Y

保存されたもの(太字フォント)

水素結合ポケットの差異(斜字体フォント)

【0374】

基質:ホモファルネソール

ホモファルネソールは、下に示されるとおりの異性を有していてもよい。

表11.ホモファルネソール異性体。

10

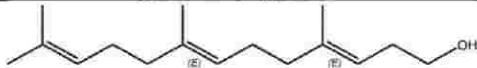
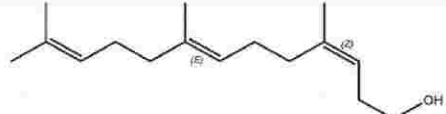
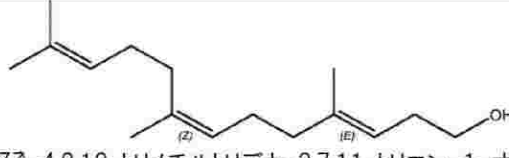
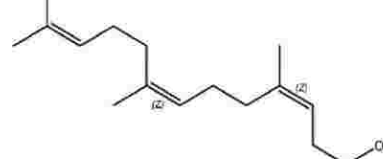
20

30

40

50

【表 1 1】

化合物	略語	名称および構造
<i>E,E</i> - ホモファルネソール	EEH	 (3 <i>E</i> ,7 <i>E</i>)-4,8,12-トリメチルトリデカ-3,7,11-トリエン-1-オール
<i>E,Z</i> - ホモファルネソール	EZH	 (3 <i>Z</i> ,7 <i>E</i>)-4,8,12-トリメチルトリデカ-3,7,11-トリエン-1-オール
<i>Z,E</i> - ホモファルネソール	ZEH	 (3 <i>E</i> ,7 <i>Z</i>)-4,8,12-トリメチルトリデカ-3,7,11-トリエン-1-オール
<i>Z,Z</i> - ホモファルネソール	ZZH	 (3 <i>Z</i> ,7 <i>Z</i>)-4,8,12-トリメチルトリデカ-3,7,11-トリエン-1-オール

10

20

【0375】

ベータ-ファルネセンは、*E,E*-ホモファルネソール(EEH)へ直接的に変換され得るか、または*E,E*-ホモファルネサート(homofarnesate)を介しEEHへ間接的に変換され得る(*E,E*-ホモファルネサートは次いでEEHへ変換される)。(・)-アンブロックスの種々の基質からの産生に関する要旨は、US2012/0135477A1、WO 2010/139719、US2013.0273619A1、WO 2013/156398A1、ならびにSeitz PhD thesis(2012、上に引用されたとおり)およびSchaefer 2011(Chemie Unserer Zeit 45,374-388)において見出され得るが、これらの内容は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0376】

US2012/0135477A1は、Schaefer(2011)(上に引用されたとおり)において本開示に従うがZmoSHCを使用する(3*Z*,7*E*)の(・)-アンブロックスへの変換について報告し、(7*E*,3*Z*)は、(・)-アンブロックスへは変換されず、9*b*-エピ-アンブロックス(すなわち、上に概説されたとおりの化合物(III))へのみ変換される。本明細書に使用されるとき、(3*Z*,7*E*)ホモファルネソールへの言及は、*E,Z*-ホモファルネソールへの言及であって、これはまたEZHとも指定される。

【0377】

ホモファルネソールは、4異性体、(3*Z*,7*Z*)、(3*E*,7*Z*)、(3*Z*,7*E*)、および(3*E*,7*E*)異性体の混合物であってもよいが、文献から、(・)-アンブロックスは(3*E*,7*E*)ホモファルネソールからしか得られないようである(上に引用されたとおりのNeumannおよびSimon(1986)を見よ)。本明細書に使用されるとき、(3*E*,7*E*)-ホモファルネソールへの言及は、*E,E*-ホモファルネソールへの言及であって、これはまたEEHとも指定される。

40

【0378】

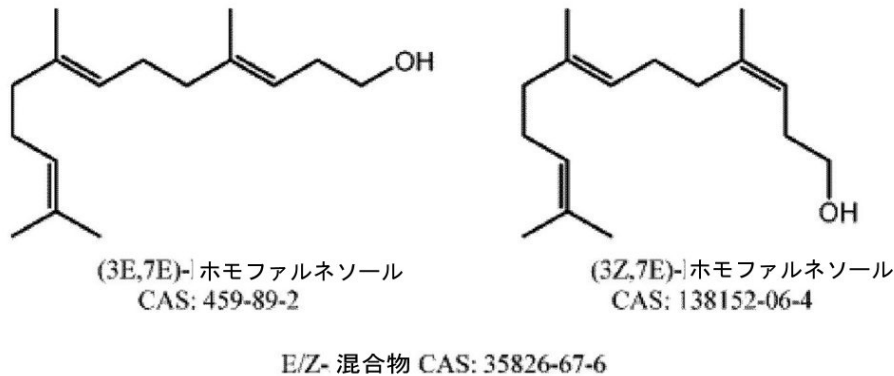
(・)-アンブロックスを調製するための本明細書に記載のプロセス用の出発材料は、例えば、(3*E*,7*E*)-ホモファルネソール、または(3*E*,7*E*)-ホモファルネソールを含む混合物、例えば(3*E*,7*E*)-ホモファルネソールを含むホモファルネソール異性体の混合物であってもよい。

【0379】

50

好ましくは、ホモファルネソール出発材料は、本明細書中EE:EZ異性体の混合物と称される、(3E,7E)と(3Z,7E)との混合物を含む。ホモファルネソールのEE:EZ異性体混合物は35826-67-6のCAS番号を有する。

【化1】



10

【0380】

ホモファルネソール供給原料/出発材料は、異性体の混合物であってもよい。結果的に、ホモファルネソール出発材料はまた、(3E,7E)、(3Z,7E)、(3Z,7Z)、および(3E,7Z)に対応する、4異性体EE:EZ:ZZ:ZEの混合物も含むことがある。好ましくは、ホモファルネソール出発材料は、以下の混合物: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]の1以上から選択される。

20

【0381】

好ましくは、ホモファルネソール出発材料は、以下の混合物: [(3E,7E)、(3Z,7E)]および/または[(3Z,7E)、(3E,7E)、および(3E,7Z)]の1以上から選択されるが、これら夫々はまた[EE:EZ]および[EE:EZ:ZE]とも指定される。

【0382】

結果的に、ある態様において、EEH:EZHの比率は、約100:00;99:01;98:02;97:03;96:04;95:05;94:06;93:07;92:08;91:09;90:10;89:11;88:12;87:13;86:14;85:15;84:16;83:17;82:18;81:19;80:20;79:21;78:22;77:23;76:24;75:25;74:26;73:27;72:28;71:29;70:30;69:31;68:32;67:33;66:34;65:35;64:36;63:37;62:38;61:39;60:40;59:41;58:42;57:43;56:44;55:45;54:46;53:47;52:48;51:49;または約50:50である。例えば、EEH:EZHの比率は、約50:50から約100:00まで、または約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及ぶこともある。

30

【0383】

いくつかの態様において、ホモファルネソール出発材料は、>90% E,E-ホモファルネソール(EEH)を含む。

他の態様において、ホモファルネソール出発材料は、86:14のEE:EZ重量比率を含む。

ある態様において、ホモファルネソール出発材料は、80:20のEE:EZ重量比率を含む。

40

【0384】

ある態様において、ホモファルネソール出発材料は、70:30のEE:EZ重量比率を含む。

さらなる態様において、ホモファルネソール出発材料は、69:31のEE:EZ重量比率を含む。

【0385】

ホモファルネソール異性体の存在数は、反応のスピードに影響を与えることもある。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションは、ホモファルネソール異性体(例として、EE:EZ:ZZ)の複雑な混合物からE,E-ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換することが可能であってもよい。しかしながら、より低い変換率が観察されることもあるが、このことは、EEH以外のホモファルネソール異性体が、SHC/HAC誘導体酵素へのアクセスに

50

対してEEHと競合し得るという観点と整合しており、よって前記異性体は、EEHの(-)-アンブロックスへの変換に係る競合インヒビターとして作用し得るか、および/または代替基質としても作用し得る(例えば、Eichhorn et al(2018)Adv.Synth.Catal.360:2339-2351を見よ、この内容は参照により本明細書に組み込まれる)。結果的に、ホモファルネソール基質は、2~4つの異性体、好ましくは2つの異性体の異性体混合物を含んでいてもよい。

【0386】

結果的に、ホモファルネソール基質は、2~4つの異性体、好ましくは2つの異性体の異性体混合物からなってもよく、または本質的にこれらからなってもよい。

好ましくは、ホモファルネソール基質は、EE:EZ異性体の混合物を含む。

好ましくは、ホモファルネソール基質は、EE:EZ異性体の混合物からなるか、または本質的にこれらからなる。

【0387】

例えば、EE:EZ異性体の混合物が使用されるなら、その場合、(-)-アンブロックス以外の化合物(例として、表3に記されるとおりの化合物II、III、およびIV)は、反応混合物の攪拌およびその結果もたらされる生物変換プロセスを容易にさせる「油状の」形態(固体形態よりむしろ)である。加えて、本明細書に開示および記載されるとおりのP1/P2/P3 SHCバリエーションが、(-)-アンブロックスを産生するための生物変換プロセスにおいてホモファルネソールを環化させるために使用されるとき、細胞:ホモファルネソール基質の低減された比率が使用されることで、反応混合物中の固体材料(例として、細胞および(-)-アンブロックス)の量の低減に繋がることもあるが、このことは、固体細胞質量が低減されるため(濾過膜の詰まり等の可能性が低くなることを意味する)、反応混合物の攪拌性(stirrability)のみならず、また下流処理にも(とくに濾過に関して)有利である。

【0388】

態様において、0.5または0.4または0.3または0.2または0.1の細胞:EEH比率が使用される。態様において、かかる細胞:EEH比率が使用されるとき、EEH変換は少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または98%から成る。態様において、かかる細胞:EEH比率は、100もしくは150もしくは200g/lのEEHが、または250g/lのEEHすら存在するときでさえも、使用される。態様において、かかる細胞:EEH比率が使用され、かつかかるEEH濃度が使用されるとき、最大で4.5もしくは5.0もしくは5.5gまでのEEHの、または5.9もしくは6.0gさへのEEHの変換が細胞のグラムあたりで変換される。かかる結果は実験パートにおいて得られている(例9を見よ)。細胞:EEH比率を参照する文脈において、EEHは、本明細書に記載のと通りのホモファルネソールの他の異性体との混合物中に存在していてもよい。我々は、ホモファルネソールの他の異性体が存在することもある場合であっても、存在するEEHの総濃度を参照する。

【0389】

ビスホモファルネソール

ビスホモファルネソールは、下の表12に示されると通りの異性を有していてもよい。

表12.ビスホモファルネソール異性体。

10

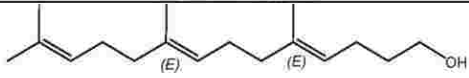
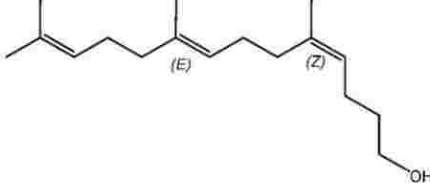
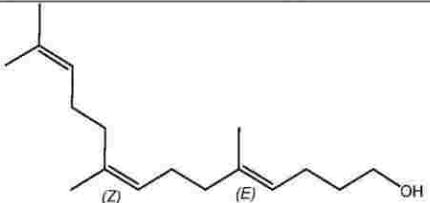
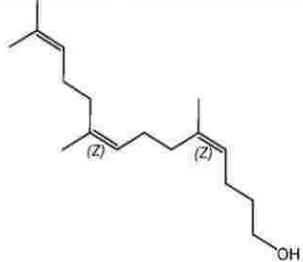
20

30

40

50

【表 1 2】

化合物	略語	名称および構造
<i>E,E</i> - ビスホモファルネソール	ビスEEH	 (4 <i>E</i> ,8 <i>E</i>)-5,9,13-トリメチルテトラデカ-4,8,12-トリエン-1-オール
<i>E,Z</i> - ビスホモファルネソール	ビスEEH	 (4 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)-5,9,13-トリメチルテトラデカ-4,8,12-トリエン-1-オール
<i>Z,E</i> - ビスホモファルネソール	ビスZEH	 (4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i>)-5,9,13-トリメチルテトラデカ-4,8,12-トリエン-1-オール
<i>Z,Z</i> - ビスホモファルネソール	ビスZZH	 (4 <i>Z</i> ,8 <i>Z</i>)-5,9,13-トリメチルテトラデカ-4,8,12-トリエン-1-オール

【0390】

ビスホモファルネソールは、WO 2021/110848に記載されるとおりE-ネロリドールから産生されてもよい。例えば、ビスホモファルネソールは、2以上の異性体の混合物(例として、E,E-ビスホモファルネソールとE,Z-ビスホモファルネソールとの混合物)として産生されてもよい。ビスホモファルネソールは4異性体((Z,Z)、(E,Z)、(Z,E)、および(E,E)の異性体)の混合物として存在することもあるが、アンブラオキシドは、E,E-ビスホモファルネソールからしか得られないようである。

【0391】

アンブラオキシドを調製するための本明細書に記載のプロセス用の出発材料は、例えば、E,E-ビスホモファルネソール、またはE,E-ビスホモファルネソールを含む混合物、例えば、E,E-ビスホモファルネソールを含むビスホモファルネソール異性体の混合物であってもよい。

【0392】

好ましくは、ビスホモファルネソール出発材料は、本明細書中EE:EZ異性体の混合物と称される、(ビスEEH)と(ビスEZH)との混合物を含む。

ビスホモファルネソール供給原料/出発材料は、異性体の混合物であってもよい。結果的に、ビスホモファルネソール出発材料はまた、4異性体EE:EZ:ZZ:ZEの混合物も含んでいてもよい。

【0393】

結果的に、ある態様において、ビスEEH:ビスEZHの比率は、約100:00;99:01;98:02;97:03;96:04;95:05;94:06;93:07;92:08;91:09;90:10;89:11;88:12;87:13;86:14;85:15;84:16;83:17;82:18;81:19;80:20;79:21;78:22;77:23;76:24;75:25;74:26;73:27;72:28;71:29;70:30;69:31;68:32;67:33;66:34;65:35;64:

36;63;37;62;38;61;39;60;40;59;41;58;42;57;43;56;44;55;45;54;46;53;47;52;48;51;49;または約50:50である。例えば、ビスEEH:ビスEZHの比率は、約50:50から約100:00まで、または約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及ぶこともある。

【0394】

いくつかの態様において、好ましくは、ビスホモファルネソール出発材料は、>90% E,E-ビスホモファルネソール(EEH)を含む。

他の態様において、ビスホモファルネソール出発材料は、86:14のビスEEH:ビスEZH重量比率を含む。ある態様において、ビスホモファルネソール出発材料は、80:20のビスEEH:ビスEZH重量比率を含む。

10

【0395】

ある態様において、ビスホモファルネソール出発材料は、70:30のビスEEH:ビスEZH重量比率を含む。

さらなる態様において、ビスホモファルネソール出発材料は、69:31または65:35のビスEEH:ビスEZH重量比率を含む。

【0396】

ビスホモファルネソール異性体の存在数は、反応のスピードに影響を与えることもある。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションは、ビスホモファルネソール異性体(例として、E,E:EE:ZE:ZZ)の複雑な混合物から、E,E-ビスホモファルネソールをアンブラオキシドへ変換することが可能であってもよい。しかしながら、より低い変換率が観察されることもあるが、このことは、ビスEEH以外のビスホモファルネソール異性体が、SHC/HAC誘導体酵素へのアクセスに対してビスEEHと競合し得るという観点と整合しており、よって前記異性体は、ビスEEHのアンブラオキシドへの変換に係る競合インヒビターとして作用し得るか、および/または代替基質としても作用し得る。結果的に、ビスホモファルネソール基質は、2~4つの異性体、好ましくは2つの異性体の異性体混合物を含んでもよい。

20

【0397】

結果的に、ビスホモファルネソール基質は、2~4つの異性体、好ましくは2つの異性体の異性体混合物からなってもよく、または本質的にこれらからなってもよい。

30

好ましくは、ビスホモファルネソール基質は、EE:EZ異性体の混合物を含む。

好ましくは、ビスホモファルネソール基質は、EE:EZ異性体の混合物からなるか、または本質的にこれらからなる。

【0398】

核酸および核酸を作製する方法

本明細書に記載のとおり(タイプ1~30の)SHC/HAC酵素バリエーションをコードする核酸が本明細書にさらに提供される。核酸は、例えば、単離された核酸であってもよい。

【0399】

とりわけ、本明細書に記載のとおりSHC/HAC酵素バリエーションをコードする核酸配列を含む構築物が本明細書に提供される。本明細書に使用されるとき、「構築物」は、人工的に創出された核酸のセグメントであって、標的細胞中へトランスフェクトされるべきものである。構築物は、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションをコードする核酸および発現のコントローラー(例として、プロモーター)を含んでもよい。

40

【0400】

本明細書に記載のとおり構築物を含むベクターが本明細書にさらに提供される。本明細書に使用されるとき、「ベクター」は、外来遺伝子材料を人工的に細胞中へ運搬するビヒクルとして使用されるDNA分子であって、細胞中これが複製および/または発現され得る。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルスベクター、コスミド、または人工染色体であってもよい。

用語「構築物」および「ベクター」は、例えば、構築物がプラスミドである場合など、

50

重複していてもよい。

【0401】

とりわけ、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、および配列番号12のいずれか1つのアミノ酸配列をコードする核酸が本明細書に提供され、下に同定されるとおりである：

態様において、配列番号38は、配列番号4によって表されるAacSHC P1をコードするヌクレオチド配列である。

【0402】

態様において、配列番号39は、配列番号5によって表されるAacSHC P2をコードするヌクレオチド配列である。

態様において、配列番号40は、配列番号6によって表されるAacSHC P3をコードするヌクレオチド配列である。

【0403】

態様において、配列番号41は、配列番号7によって表されるSHC#65 P1バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

態様において、配列番号42は、配列番号8によって表されるSHC#65 P2バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

【0404】

態様において、配列番号43は、配列番号9によって表されるSHC#65 P3バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

態様において、配列番号44は、配列番号10によって表される215G2 P1バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

【0405】

態様において、配列番号45は、配列番号11によって表される215G2 P2バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

態様において、配列番号46は、配列番号12によって表される215G2 P3バリエーションをコードするヌクレオチド配列である。

【0406】

用語「核酸」または「核酸分子」は、本明細書に使用されるとき、具体的に言うと、DNA、cDNA、ゲノムDNA、合成DNA、またはRNAであり得、かつ二本鎖もしくは一本鎖のセンス鎖および/またはアンチセンス鎖であり得る本開示のポリヌクレオチドを指すこととする。用語「核酸」または「核酸分子」は具体的に、本明細書に使用されるとき、例として、完全長ヌクレオチド配列またはそのフラグメントもしくは一部としての、ポリヌクレオチド(単数または複数)へ適用されることとし、前記ポリヌクレオチドは夫々、酵素活性、例として、代謝経路の酵素をもつポリペプチド、またはそのフラグメントもしくは一部をコードする。

【0407】

用語はまた、cDNA(ここで対応するゲノムDNAは、イントロンを有する)などの別々の分子、したがって、異なる配列;隣接する(flanking)遺伝子同士の少なくとも1つを欠くゲノムのフラグメント;ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって産生され、かつ隣接する遺伝子同士の少なくとも1つを欠くcDNAまたはゲノムDNAのフラグメント;隣接する遺伝子同士の少なくとも1つを欠く制限フラグメント;融合タンパク質(例として、Hisタグ)、ムテイン、または所定タンパク質のフラグメントなどの天然には存在しないタンパク質をコードするDNA;およびcDNAまたは天然に存在する核酸の縮重したバリエーションである核酸も包含する。加えて、これは、ハイブリッド遺伝子、すなわち、天然には存在しない融合タンパク質をコードする遺伝子の一部である、組換えのヌクレオチド配列を包含する。融合タンパク質は、1以上のアミノ酸(これらに限定されないが、ヒスチジン(His)など)をタンパク質へ、大抵タンパク質のN末端にて、これのみならずC末端にても付加し得るか、またはタンパク質領域内へ融合され得る。かかる融合タンパク質またはかかるタンパク質をコードする融合ベクターは典型的には、(i)組換えのタンパク質の産生を増大させ

10

20

30

40

50

るため;(ii)組換えのタンパク質の可溶性を増大させるため;および(iii)親和性精製用リガンドを提供することによって組換えタンパク質の精製に役立たせるためという3つの目的を果たす。

【0408】

用語「核酸」または「核酸分子」はまた、具体的な微生物の宿主細胞(例として、*E. coli* 宿主細胞)における発現に好適なコドン最適化配列も包含する。本明細書に使用される時、用語「コドン最適化」は、1以上のまたは好ましくは有意数のコドンの、細菌(例として、*E. coli*)宿主細胞の遺伝子においてより頻繁に使用されるコドンの置換によって、原核生物または真核生物の宿主細胞、具体的に、*E. coli* 宿主細胞などの細菌の宿主細胞における発現に適応させた核酸のタンパク質コード配列を意味する。

10

【0409】

この点に関し、参照アミノ酸配列(配列番号1もしくは2もしくは3、またはその遺伝子)をコードするヌクレオチド配列は、例として*E. coli*などの、選択された宿主生物にコドン最適化され得る。

野生型AacSHC(配列番号1)をコードするヌクレオチド配列は、配列番号35である。

親SHC(配列番号2)をコードするヌクレオチド配列は、配列番号36である。

他の親SHC(配列番号3)をコードするヌクレオチド配列は、配列番号37である。

【0410】

リボ核酸(RNA)分子は、*in vitro*での転写によって產生され得る。DNA分子のセグメントもまた、本開示の範囲内にあると見なされ、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって產生され得るか、または1以上の制限エンドヌクレアーゼでの処置によって生成され得る。核酸分子のセグメントは、遺伝子のDNAフラグメント、とりわけ部分的な遺伝子のDNAフラグメントと称されることもある。フラグメントはまた、数個のオープンリーディングフレーム(ORF)も含有し得、これは同じORFの反復または異なるORFの反復のいずれかである。用語は、具体的に言うと、コードヌクレオチド配列を指すものとするが、非コード、例として、非転写もしくは非翻訳の配列であるヌクレオチド配列、またはポリペプチドを全部もしくは一部コードするヌクレオチド配列もまた包含するものとする。遺伝子、例として、集合、多様化、または組換えのための遺伝子は、本明細書に使用されるとき、組換え事象を成功させるのに十分な配列長さを有する、非コード配列、またはポリペプチドをコードする配列もしくはタンパク質をコードする配列、あるいはそれらの一部またはフラグメントであり得る。より具体的に言うと、該遺伝子は、最短3bp、好ましくは少なくとも100bp、より好ましくは少なくとも300bpの長さを有する。単離されたDNAへの言及が、例えば、制限消化反応混合物もしくは電気泳動ゲル薄片中の、例えば、cDNA内またはゲノムDNAライブラリ内またはゲノムDNA制限消化物内の、数百~数百万の他のDNA分子の中に存在するDNAを意味しないことは、上記から明らかであろう。本開示の単離された核酸分子は、それ自体が天然の状態では見出されないセグメントを網羅する。

20

30

【0411】

本明細書に使用されるとき、用語「単離されたDNA」は、(1)天然に存在するいずれの配列とも、天然には存在しないポリヌクレオチド、核酸の配列(例として、ヒトの介入(例として、単離された核酸のセグメントの人工的手技、例として、遺伝子工学技法による)を通して別様に分離された2つの配列のセグメントの人為的な組み合わせによって作製された)とも同一ではない配列を含有するDNA、または(2)天然に存在する配列をもつDNA(例として、cDNAまたはゲノムDNA)という文脈において、関心のあるDNAを含有する遺伝子が天然に存在する生物のゲノム中、関心のあるDNAを含有する遺伝子と隣接する少なくとも1つの遺伝子がないDNAを指し得る。

40

【0412】

また用語「単離されたDNA」は、本明細書に使用されるとき、核酸配列に関して具体的に言うと、組換えDNA技法によって產生された核酸またはポリヌクレオチド、例として、宿主細胞に対しては異種のポリヌクレオチドを含むDNA構築物(これは任意に、宿主

50

細胞中へ組み込まれる)をも指してもよい。キメラのヌクレオチド配列は、具体的に言うと、組換え分子として産生されてもよい。用語「組換え」は具体的に言うと、交差または遺伝子モザイクを実現する組換えの有無にかかわらず、ポリヌクレオチドまたはそれらの一部と一緒に結び合わせる、かかるポリヌクレオチドの集合へ適用することとする。例えば、所望される機能の核酸セグメントと一緒に結び合わせることが実施されることで、所望される機能の組み合わせが生成される。本明細書に記載のポリペプチドをコードする組換え遺伝子は、そのポリペプチドを発現するのに好適な1以上の調節領域とセンス配向で作動可能に(operably)連結されている、そのポリペプチドをコードする配列を包含してもよい。多くの微生物が複数の遺伝子産物を多シストロン性のmRNAから発現することが可能であるので、所望される場合、複数のポリペプチドは、それら微生物において、単一の調節領域の制御下で発現され得る。コード配列および調節領域は、調節領域およびコード配列が、調節領域が配列の転写または翻訳を調節するのに有効であるように位置付けられているとき、作動可能に連結されていると見なされる。

10

【0413】

用語「組換え(の)」は、本明細書に使用されるとき、酵素に関して具体的に言うと、組換えDNA技法によって産生される酵素、すなわち、所望の酵素をコードする外来性DNA構築物によって形質転換された細胞から産生される酵素を指すものとする。「合成(の)」酵素は、化学合成によって調製される酵素である。キメラの酵素は、具体的に言うと、組換え分子として産生されてもよい。したがって、用語「組換えDNA」は、ベクター中へ、自発的に複製するプラスミドまたはウイルス中へ、あるいは原核生物もしくは真核生物のゲノムDNA中へ(または相同の細胞のゲノム中へ、天然の染色体の場所以外の位置にて)組み込まれる組換えDNAを包含する。

20

【0414】

さらなる側面において、本開示の核酸分子(単数または複数)は、発現制御配列へ動作可能に(operatively)連結されていることで、原核生物および/または真核生物の宿主細胞における発現が可能になる。本明細書に使用されるとき、「動作可能に連結されている」は、発現制御配列が、関心のあるコード配列の発現を有効に制御するように、遺伝子構築物中へ組み込まれていることを意味する。上に言及された転写/翻訳の調節要素は、これらに限定されないが、誘導性および非誘導性の、構成的な、細胞周期を調節する、代謝を調節する、プロモーター、エンハンサー、オペレーター、サイレンサー、リプレッサー、および当業者に知られておりかつ遺伝子発現を推進するかまたは別様に遺伝子発現を調節する他の要素を包含する。かかる調節要素は、これらに限定されないが、例えばtet-onもしくはtet-off系、lac系、trp系の調節要素上に、採用されると例えCUP-1プロモーター、tet-リプレッサーといった、構成的な発現に向けるかまたは誘導発現を可能にする調節要素を包含する。一例として、イソプロピルβ-D-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)は、100μM~1.0mMの濃度範囲における、遺伝子発現の有効な誘導因子である。この化合物は、lacオペロンの転写を始動させるアロラクトースの分子模倣体、ラクトース代謝体であって、したがって、遺伝子がlacオペレーターの制御下にあるとき、遺伝子発現を誘導させるのに使用される。遺伝子発現を誘導する調節要素の別の例は、ラクトースである。同様に、本開示の核酸分子(単数または複数)は、追加のポリペプチド配列、例えば、マーカーまたはレポーターとして機能する配列をコードするハイブリッド遺伝子の一部を形成し得る。マーカーおよびレポーター遺伝子の例は、ベータ-ラクタマーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、アデノシンデアミナーゼ(ADA)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼジヒドロ葉酸レダクターゼ(DHFR)、ハイグロマイシン-B-ホスホトランスフェラーゼ(HPH)、チミジンキナーゼ(TK)、lacZ(ベータ-ガラクトシダーゼをコードする)、およびキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(XGPRT)を包含する。本開示の実践に関連する標準的な多く手順と同様に、当業者は、追加の有用な試薬、例えば、マーカーまたはレポーターの機能を果たし得る追加の配列を承知しているであろう。

30

40

【0415】

50

いくつかの態様において、本開示は、発現用および任意の精製用のベクター中へ挿入されてもよい、SHC/HAC酵素またはそのバリエーションをコードする組換えポリヌクレオチドを提供する。あるタイプのベクターは、環状の二本鎖DNAループに象徴されるプラスミドであって、前記プラスミド中へ追加のDNAセグメントがライゲートされる。あるベクターは、遺伝子の発現を制御し得るが、前記遺伝子へそのベクターが機能的に連結されている。これらのベクターは「発現ベクター」と呼ばれる。大抵、DNA組換え技法に好適な発現ベクターは、プラスミドタイプに属する。典型的には、発現ベクターは、本明細書に記載のとおりSHC/HAC酵素またはそのバリエーションなどの遺伝子を含む。本記載において、用語「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがほとんどの場合に使用されるベクタータイプであるところ、互換的に使用されてもよい。

10

【0416】

かかるベクターは、これらに限定されないが、宿主細胞中天然には存在しないDNA配列、通常、転写されてRNAになることも翻訳されてタンパク質になる（「発現される」）こともないDNA配列、および非組換え宿主中へ導入されることが所望される他の遺伝子またはDNA配列を包含するDNA配列を包含し得る。典型的には、本明細書に記載の組換え宿主のゲノムは、1以上の組換え遺伝子の安定した導入を通して拡大させられることが解されるであろう。しかしながら、自律性もしくは複製のプラスミドまたはベクターもまた、本開示の範囲内において使用され得る。その上、本開示は、低コピー数、例として、単一コピーの、もしくは高コピー数（本明細書中に例示されるとおり）のプラスミドまたはベクターを使用して実践され得る。

20

【0417】

好ましい態様において、本開示のベクターは、プラスミド、ファージミド、ファージ、コスミド、細菌人工染色体および酵母人工染色体、ノックアウト構築物またはノックイン構築物、合成の核酸配列またはカセットおよびサブセットを包含し、これらは、線状のポリヌクレオチド、プラスミド、メガプラスミド、合成または人工の染色体（植物、細菌、哺乳動物、もしくは酵母の人工染色体など）の形態で産生されてもよい。

【0418】

導入ポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質は、ベクターが導入されたら、細胞内で発現されることが好ましい。多様な遺伝子基質がプラスミド中へ組み込まれてもよい。プラスミドはしばしば、標準的なクローニングベクター、例として、細菌の多コピープラスミドである。基質は、同じプラスミドまたは異なるプラスミド中へ組み込まれ得る。少なくとも2つのタイプのベクターを含有する細胞の選択を可能にするため、異なるタイプの選択可能マーカーを有する少なくとも2つの異なるタイプのプラスミドがしばしば使用される。

30

【0419】

典型的には、細菌性細胞または酵母細胞は、当該技術分野において周知なとおり1以上のいずれのヌクレオチド配列で形質転換されてもよい。in vivoでの組換えにつき、ゲノムまたは他の遺伝子で組換えられる遺伝子は、標準的な形質転換技法を使用して宿主を形質転換するのに使用される。好適な態様において、複製起点を提供するDNAは、構築物中に包含されている。複製起点は、当業者によって好適に選択されてもよい。遺伝子の性質に依存し、配列が既に、複製起点それ自体として作動可能である遺伝子またはゲノムとともに存在する場合、補充される複製起点は不要なこともある。

40

【0420】

宿主細胞、宿主細胞を作製する方法、ならびに宿主細胞を使用してアンブロックスおよびアンブラオキシドを作製する方法

本明細書に記載のとおり核酸配列または構築物またはベクターを含む組換え宿主細胞が本明細書にさらに提供される。本明細書に記載のとおりSHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞が本明細書にさらに提供される。組換え宿主細胞はまた、遺伝子操作された(engineered)細胞、または細胞とも指名されてもよい。

【0421】

50

(-)-アンプロックスまたはアンブラオキシドを産生するための本明細書に記載のプロセスは、例えば、本明細書に記載のとおり組換え宿主細胞を培養することを含んでもよい。本明細書に使用されるとき、用語「培養すること」は、生細胞が、本明細書に記載のとおり(-)-アンプロックスまたはアンブラオキシドを産生するためのプロセスにおいて使用され得る、本明細書に記載のとおりSHC/HAC酵素または酵素バリエーション(タイプ1~30のものなど)を産生するように、生細胞を産生するプロセスを指す。細胞にとって、細胞自体を分裂させて複製することは不要であるが、これは排除されない。

【0422】

細菌性細胞または酵母細胞は、外来性DNAまたは異種DNAが細胞内部に導入されたとき、かかるDNAによって形質転換されてもよい。形質転換するDNAは、組み入れられてもよくまたは組み入れられていなくてもよく、すなわち、細胞のゲノム中へ共有結合的に連結されていてもまたは連結されていなくてもよい。原核生物および酵母において、例えば、形質転換するDNAは、プラスミドなどのエピソーム要素上に維持されていてもよい。真核細胞に関し、安定的にトランスフェクトされた細胞は、染色体の複製を通じ娘細胞によって遺伝されるように、トランスフェクトされたDNAが染色体中へ組み入れられた細胞である。この安定性は、形質転換するDNAを含有する娘細胞の集団から構成される細胞株またはクローンを確立する真核細胞の能力によって実証される。

【0423】

一般に、導入されたDNAは、DNAのレシピエントである宿主中には本来存在しないものであるが、所定宿主からDNAセグメントを単離すること、および続いて、そのDNAの1以上の追加のコピーを同じ宿主中へ、例として、遺伝子産物の産生を増強するかまたは遺伝子の発現パターンを改変するために導入することは、本開示の範囲内にある。いくつかの場合において、導入されたDNAは、例として、相同組換えもしくは部位特異的変異誘発によって、内在性の遺伝子またはDNA配列を改良するか、あるいはこれを置き換えることとするであろう。好適な組換え宿主は、微生物、植物細胞、および植物を包含する。

【0424】

本開示はまた、組換え宿主も特色とする。また「遺伝子学的に改良された宿主細胞」もしくは「トランスジェニック細胞」とも称される用語「組換え宿主」は、異種の核酸を含むか、または少なくとも1つの組み込まれたDNA配列によって拡大させられたゲノムを含む宿主細胞を表す。本開示の宿主細胞は、上に概説されたとおりのポリヌクレオチドまたはベクターで遺伝子操作されていてもよい。

【0425】

本開示の目的上使用されてもよい宿主細胞は、これらに限定されないが、細菌(例えば、*E. coli*および*B. subtilis*)などの原核細胞(これは、例えば、本開示のポリヌクレオチド分子を含有する、例えば、組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNA、細菌の人工染色体、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換されていてもよい);酵母(例えば、*Saccharomyces*および*Pichia*)といった単純な真核細胞(これは、例えば、本開示のポリヌクレオチド分子を含有する、例えば、組換え酵母発現ベクターで形質転換されていてもよい)を包含する。本開示のポリヌクレオチドを導入するのに使用される宿主細胞および夫々のベクターに依存し、ポリヌクレオチドは、例えば、染色体もしくはミトコンドリアDNA中へ組み入れられ得るか、または、例えば、エピソームといった染色体外で維持され得るか、または一過的にのみ細胞中に含まれ得る。

【0426】

用語「細胞」は、とりわけ遺伝子工学および1以上の遺伝子もしくは遺伝子の集合クラスター(assembled cluster)を細胞または産生細胞中へ導入することを参照して本明細書に使用されるとき、原核生物または真核生物のいずれの細胞も指すことが理解される。*E. coli*もしくは*Bacillus sp.*といった細菌の宿主細胞、*S. cerevisiae*などの酵母の宿主細胞、*Spodoptera frugiperda*などの昆虫の宿主細胞、またはHeLaおよびJurkatなどのヒトの宿主細胞を包含する、原核生物および真核生物の宿主細胞は両方とも、本開

示に従う使用に企図される。

【0427】

具体的に言うと、細胞は、真核細胞(好ましくは、真菌)、哺乳動物もしくは植物の細胞、または原核細胞である。好適な真核細胞は、例えば、限定せずに、哺乳動物細胞、酵母細胞、または昆虫細胞(Sf9を包含する)、両生類動物細胞(メラニン保有細胞を包含する)、またはCaenorhabditis(Caenorhabditis elegansを包含する)の細胞を包含する蠕虫細胞を包含する。好適な哺乳動物の細胞は、例えば、限定せずに、COS細胞(Cos-1およびCos-7を包含する)、CHO細胞、HEK293細胞、HEK293T細胞、HEK293 T-RexTM細胞、または他のトランスフェクト可能な(transfectable)真核細胞株を包含する。好適な細菌性細胞は、限定せずに、E.coliを包含する。

10

【0428】

好ましくは、E.coli、Bacillus、Streptomycesなどの原核生物、またはHeLa細胞もしくはJurkat細胞といった哺乳動物の細胞、またはArabidopsisといった植物細胞が使用されてもよい。

細胞は、例えば、原核生物、酵母、植物、および/または昆虫の宿主細胞から選択されてもよい。

【0429】

好ましくは、細胞は、Aspergillus sp.または真菌細胞であり、好ましくは、属Saccharomyces、Candida、Kluyveromyces、Hansenula、Schizosaccharomyces、Yarrowia、Pichia、およびAspergillusからなる群から選択され得る。

20

【0430】

好ましくは、細胞は、細菌細胞、例えば、Escherichia、Streptomyces、Bacillus、Pseudomonas、Lactobacillus、およびLactococcusから選択される属を有する。例えば、細菌は、E.coliであってもよい。

好ましくは、E.coli宿主細胞は、産業界および規制当局によって承認されているE.coli宿主細胞である(これらに限定されないが、E.coli K12宿主細胞またはE.coli BL21宿主細胞を包含する)。

【0431】

本開示で使用する1つの好ましい宿主細胞はE.coliであって、これは本明細書に記載のとおり組換えで調製されてもよい。よって、組換え宿主は、組換えE.coli宿主細胞であってもよい。E.coliについて利用可能な、突然変異体のライブラリ、プラスミド、代謝の詳細なコンピュータモデル、および他の情報が存在しており、産物の収率を増強する様々なモジュールの合理的設計を可能にする。Saccharomycesに係る上に記載の方法と同様の方法が、組換えE.coli微生物を作製するためにも使用され得る。

30

【0432】

一態様において、組換えE.coli微生物は、SHC/HAC酵素または酵素バリエーション遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含む。

好ましくは、組換えE.coli微生物は、本明細書に記載のとおりベクター構築物を含む。別の好ましい態様において、組換えE.coli微生物は、本明細書に開示のSHC/HAC酵素および酵素バリエーションをコードするヌクレオチド配列を含む。

40

【0433】

本開示で使用する別の好ましい宿主細胞は、合成生物学において幅広く使用される、シャーシ(chassis)となる生物のS.cerevisiaeである。よって、組換え宿主はS.cerevisiaeであってもよい。S.cerevisiaeについて利用可能な、突然変異体のライブラリ、プラスミド、代謝の詳細なコンピュータモデル、および他の情報が存在しており、産物の収率を増強する様々なモジュールの合理的設計を可能にする。組換えS.cerevisiae微生物を作製するための方法は知られている。

【0434】

細胞の培養は従来のやり方で実施されてもよい。培養培地は、炭素供給源、少なくとも1つの窒素供給源、および無機塩を含有していてもよく、ビタミンがそれへ加えられてい

50

る。この培地の構成物質は、問題になっている微生物種を培養するために従来使用されているものであり得る。その方法において使用される炭素供給源は、成長および/または(-)-アンブロックスもしくはアンブラオキシドの産生を容易にさせ、組換え宿主細胞によって代謝され得るいずれの分子も包含する。好適な炭素供給源の例は、これらに限定されないが、スクロース(例として、糖蜜に見出されるとおり)、フルクトース、キシロース、グリセロール、グルコース、セルロース、デンプン、セロビオース、またはポリマーを含む他のグルコースを包含する。

【0435】

酵母を宿主として採用する態様において、例えば、スクロース、フルクトース、キシロース、エタノール、グリセロール、およびグルコースなどの炭素供給源が好適である。炭素供給源は、培養期間を通してずっと宿主生物へ提供され得るか、または代替的に、生物は、別のエネルギー供給源(例として、タンパク質)の存在下、一定期間成長させられて、次いでフェドバッチ(fed-batch)相の最中のみ炭素の供給源が提供され得る。

【0436】

本開示の方法における使用のための組換え宿主細胞微生物の好適性は、周知方法を使用する単純な試験手順によって決定されてもよい。例えば、試験されるべき微生物は、微生物の増殖のために一般的に使用されるpH、温度にて、および反応条件下で、富栄養培地(rich medium)(例として、LB培地、Bacto-tryptone酵母抽出物培地、栄養培地等)中、増殖させられてもよい。生物変換の所望される産物を産生する組換え微生物(すなわち、組換え宿主細胞)が選択されると、産物は典型的には、好適な発現系および発酵によって、例として、細胞培養における微生物の産生によって大規模に、産生宿主細胞株によって産生される。本開示の一態様において、M9Aなどの限定最小培地が、細胞培養のために使用される。

【0437】

M9A培地の構成要素は、以下:14g/l KH_2PO_4 、16g/l K_2HPO_4 、1g/l クエン酸 $\text{Na}_3.2\text{H}_2\text{O}$ 、7.5g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.25g/l $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 、0.015g/l $\text{CaCl}_2.2\text{H}_2\text{O}$ 、5g/l グルコース、および1.25g/l 酵母抽出物)を含む。

本開示の別の態様において、LBなどの富栄養培地(nutrient rich medium)が使用された。LB培地の構成要素は、次:10g/l トリプトン、5g/l 酵母抽出物、5g/l NaCl を含む。無機培地およびM9無機培地の他の例は、例えば、US 6524831B2およびUS 2003/0092143A1に開示されている。

【0438】

最小培地の別の例は以下のとおりに調製されてもよい:350ml 培養について:35ml クエン酸/リン酸塩ストック(pHが6.3へ調整された、133g/l KH_2PO_4 、40g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、17g/l クエン酸 $\cdot \text{H}_2\text{O}$)へ307ml H_2O を加え、必要に応じ32% NaOH でpHを6.8へ調整した。オートクレーブ後、0.850ml 50% MgSO_4 、0.035ml 微量元素溶液(下を見よ)、0.035ml チアミン溶液、および7ml 20% グルコースを加えた。

【0439】

微量元素溶液:脱イオン水中、50g/l $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20g/l $\text{FeSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 、3g/l H_3BO_3 、0.9g/l $\text{MnSO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ 、1.1g/l CoCl_2 、80g/L CuCl_2 、240g/l $\text{NiSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$ 、100g/l KI 、1.4g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}.4\text{H}_2\text{O}$ 、1g/l $\text{ZnSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$

チアミン溶液:脱イオン水中2.25g/l チアミン $\cdot \text{HCl}$

MgSO_4 溶液:脱イオン水中50%(w/v) $\text{MgSO}_4.7\text{H}_2\text{O}$

【0440】

組換えの微生物は、バッチ、フェドバッチ、もしくは連続プロセス、またはそれらの組み合わせにおいて成長させられてもよい。ホモファルネソールをアンブロックスへ変換するのに、またはビスホモファルネソールをアンブラオキシドへ変換するのに十分な酵素を産生するため、および所望される量のアンブロックス((-)-アンブロックスを包含する)、または所望される量の式(X)で表されるアンブラオキシドを産生するため、典型的には、組換え微生物は、発酵槽(fermentor)中、定義された温度(単数または複数)にて、好適

な栄養供給源(例として、炭素供給源)の存在下、所望される期間成長させられる。組換え宿主細胞は、いずれの好適なやり方でも、例えば、バッチ培養またはフェドバッチ培養によって培養されてもよい。

【0441】

本明細書に使用されるとき、用語「バッチ培養」は、培養培地および/または栄養素が、培養の最中に加えられることも取り除かれることもない培養方法である。

本明細書に使用されるとき、用語「フェドバッチ」は、培養培地および/または栄養素が、培養の最中に加えられるが、培養培地は取り除かれない培養方法を意味する。

【0442】

本開示の一態様は、細胞系において(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを産生する方法(またはプロセス)を提供するが、前記方法は、細胞系において好適な条件下でSHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生すること、ホモファルネソールまたはビスホモファルネソールを細胞系へ加えること、細胞系を使用して産生されたSHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションを使用して、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換することまたはビスホモファルネソールをアンブラオキシドへ変換すること、(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを細胞系から収集すること、および任意に、(-)-アンブロックス材料または式(X)で表されるアンブラオキシドを系から単離することを含む。

【0443】

本明細書に以前開示されたSHC/HAC酵素バリエーションの各々は、SHC/HAC酵素バリエーションの(とくに本明細書に以前開示されたタイプ1~30の各々)このプロセスにおいて使用されてもよい。

【0444】

態様において、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスが提供されるが、プロセスは、アミノ酸改変を、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にて有するアミノ酸配列のSHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含む。

【0445】

態様において、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスが提供されるが、プロセスは、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、および/または配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、20

8、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310と少なくとも30%の同一性あるいは類似性をもつアミノ酸配列を有し、かつ配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310としての野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列における位置にてアミノ酸改変を有するSHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含む。

【0446】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0447】

態様において、該プロセスに使用されるSHC/HACバリエーションにおけるアミノ酸改変は以下である：

- 配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、
- 配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または
- 配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる。

【0448】

態様において、該プロセスに使用されるSHC/HACバリエーションにおけるアミノ酸改変は以下である：

- 配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の位置168でのアミノ酸がSであるか、または配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383の168に対応する野生型SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸がSである。

【0449】

態様において、該プロセスに使用されるSHC/HACバリエーションは以下である：

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつW169G突然変異を有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169GおよびG600Mを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169GおよびA306Vの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号7、8、9、または386と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、以下の突然変異：M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、ならびに以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号10、11、12、または385と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、以下の突然変異：M132R、A224V、I432Tを有し、ならびに以下の突然変異：W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する。

【0450】

この文脈において、同一性または類似性は、少なくとも71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0451】

態様において、該プロセスに使用されるSHC/AHCバリエーションにおけるアミノ酸改変は、配列番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、305、306、302、304、311、312、313、353、354、355、356、357、358、359、360、350、386、もしくは385を含むか、またはそれからなるか、または本質的にそれからなる、アミノ酸配列を有する。

10

【0452】

態様において、該プロセスに使用されるSHC/AHCバリエーションにおけるアミノ酸改変は、配列番号315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、もしくは352を含むか、またはそれからなるか、または本質的にそれからなる、アミノ酸配列を有する。

【0453】

他のヌクレオチド配列の発現が、方法を増強するのに役立つこともある。生物変換方法は、細胞系における他のヌクレオチド配列の追加の発現を包含し得る。他のヌクレオチド配列の発現は、(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するための生物変換経路を増強することもある。本開示のさらなる態様は、(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製する生物変換方法であるが、前記方法は、SHC/HAC酵素バリエーション遺伝子を含む宿主細胞を成長させること、宿主細胞においてSHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生すること、ホモファルネソール(例として、EEH)またはビスホモファルネソール(例として、ビスEEH)を宿主細胞へ供給すること、ホモファルネソールの(-)-アンブロックスへの変換またはビスホモファルネソールのアンブラオキシドへの変換を促進するのに好適なpH、温度、および可溶化剤の条件下で宿主細胞をインキュベートすること、ならびに(-)-アンブロックスまたは式(X)で表されるアンブラオキシドを収集することを含む。宿主細胞におけるSHC/HAC酵素または酵素バリエーションの産生は、ホモファルネソールまたはビスホモファルネソールが好適な反応条件下で宿主細胞へ加えられたときに(-)-アンブロックスまたは式(X)で表されるアンブラオキシドを作製する方法を提供する。達成される変換は、より多くの生体触媒およびSDSを反応混合物へ加えることによって増強されることもある。

20

30

【0454】

組換え宿主細胞微生物は、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生しこれに続く生物変換ステップに好適な量の細胞を提供するために、数多の形で培養されてもよい。生物変換ステップに適用可能な微生物は広範であるところ(例として、酵母、細菌、および真菌)、培養条件は当然ながら、各種の特定要件に対し調整され、かつこれらの条件は周知であって文書化されている。組換え宿主細胞微生物の細胞を成長させるための、当該技術分野で知られている方法のいずれも、これに続く本開示の生物変換ステップに利用される細胞を産生させるのに使用されてもよい。典型的には、細胞は、具体的な密度(光学密度(OD)として測定可能な)まで成長させられて、生物変換反応に十分なバイオマスを産生する。

40

【0455】

選ばれる培養条件は、得られる細胞の量(バイオマス)に影響を与えるのみならず、培養条件の質もまた、バイオマスがいかにか生体触媒になるかに影響を与える。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションの遺伝子を発現してSHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞微生物は、生物変換反応における使用に好適な生体触媒と称される。いくつかの態様において、生体触媒は、SHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションを産生す

50

る組換え全細胞であるか、または懸濁液型もしくは固定化型であってもよい。他の態様において、生体触媒は、SHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションを産生する組換え全細胞から調製される膜画分または液体画分である(例えば、上に引用されたとおりのSeitz et al 2012に開示されるとおり)。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生する組換え生体触媒は、発酵槽(fermenter)から収集された全細胞(生物変換反応のための)、または発酵槽中の細胞(これは、次いでワンポット反応に使用される)を包含する。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生する組換え生体触媒は、無傷の(intact)組換え全細胞、および/または細胞デブリ、および/または透過性(permeabilized)細胞、および/またはスフェロプラスト(<https://chemrxiv.org/engage/chemrxiv/search-dashboa>rd?text=Hauerを見よ)、および/または細胞抽出物、および/または細胞膜を包含し得る。どちらにしても、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションは、基質(例として、ホモファルネソールもしくはビスホモファルネソール)を受け取るかおよび/またはそれと相互作用するために、ある形で膜(細胞膜などの)と結び付けられているが、その膜(細胞膜などの)は、全細胞の一部であり得るか、または全細胞(例として、組換え全細胞)を含み得る。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションはまた、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションが基質(例として、ホモファルネソールもしくはビスホモファルネソール)との相互作用を可能にさせる固定化形態(例として、酵素の担体と結び付けられている)であってもよい。SHC/HAC酵素または酵素バリエーションはまた、可溶形態で使用されてもよい。

10

【0456】

好ましい態様において、本開示のプロセスは、組換え全細胞を生体触媒として使用し実行される。理論によって拘束されることは望まないが、全細胞の適切な量での使用は、(i) SHC酵素(これは膜に結び付けられている)の全体性が維持されるように見えること;および(ii)細胞が反応中の油状(すなわち液体)基質の分布にプラスの寄与を有することもあることから、有利である。組換え全細胞の生体触媒としての使用は、基質(これは液体形態にある)の分布には助かることもあるが、(-)-アンブロックス産物(これは固体形態にある)の分布の助けにはならない。

20

【0457】

一態様において、生体触媒は、生物変換ステップを開始する前に、十分な量(充分なバイオマスを創出するのに)で産生され、回収されて洗浄される(および任意に保管される(例として、冷蔵されるか、凍結されるか、または凍結乾燥される))。

30

【0458】

さらなる態様において、細胞は十分な量(充分な生体触媒を創出するのに)で産生され、次いで反応条件が、生物変換反応のために生体触媒を回収し洗浄する必要なく調整される。この1ステップ(または「ワンポット」)方法は、おそらくコストを低減しつつ、プロセスを簡素化するため有利である。細胞を成長させるのに使用される培養培地はまた、生物変換反応における使用にも好適であるが、ただし反応条件は、生物変換反応を容易にするよう調整される。

【0459】

細胞を成長させるのに最適なpHは、6.0~7.0の範囲にある。生物変換反応に最適なpHは、生物変換反応に使用されるタイプのSHC/HAC酵素または酵素バリエーションに依存する。pHは、当業者に周知な技法を使用して調節される。

40

【0460】

本開示において、用語「混合物」または「反応混合物」は用語「培地(媒体)」と交換可能に使用されてもよいが(とくにこれが「ワンポット」反応に関するとき)、充分なバイオマスを創出するために細胞を成長させるには、細胞培養/発酵培地を要するが、培地は、反応緩衝剤が好適なpHにて事足りるであろうことから、生物変換ステップに要されないことに留意すべきである。

【0461】

本開示の生物変換方法は、ホモファルネソールまたはビスホモファルネソールの供給原料(例として、EEHもしくはビスEEHを含む)の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシ

50

ドへの変換を提供する、時間、温度、pH、および可溶化剤の条件下で実行される。

【0462】

反応混合物のpHは、SHC/HAC酵素バリエーションにつき4~8、好ましくは5~6.5、より好ましくは4.8~6.0の範囲にあってもよく、野生型SHC/HAC酵素につき約pH5.0から約pH7.0までの範囲にあってもよく、緩衝剤の反応混合物への添加によって維持され得る。このための例示の緩衝剤は、これらに限定されないが、クエン酸緩衝剤、リン酸塩緩衝液、酢酸緩衝剤、および/またはコハク酸緩衝剤を包含する。

【0463】

野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションに最適なpH範囲は、約5から約7まで、約5から約6.5まで、または約5から約6までであってもよい。

【0464】

好ましい温度は、約15℃と約60℃との間であり、例えば、約15℃から約50℃まで、または約15℃から約45℃まで、または約30℃から約60℃まで、または約30℃から約40℃まで、または約35℃から約40℃まで、または約40℃から約45℃まで、または約40℃から約50℃までである。温度は、一定に保たれ得るか、または生物変換プロセスの最中に改変され得る。

【0465】

本明細書に記載の野生型SHC/HAC酵素またはSHC/HAC酵素バリエーションの最適温度範囲は、例えば、約25℃から約55℃まで、約25℃から約50℃まで、約30℃から約55℃まで、または約30℃から約50℃までであってもよい。

本出願人は、生物変換反応において可溶化剤(例として、界面活性剤、洗浄剤、可溶性エンハンサー、水混和性の有機溶媒等)を包含させると有用な場合もあることを実証した。

【0466】

本明細書に使用されるとき、用語「界面活性剤」は、2液体同士間または液体と固体との間の表面張力(もしくは界面張力)を低下させる構成要素を意味する。界面活性剤は、洗浄剤、湿潤剤、乳化剤、発泡剤、および分散剤として作用してもよい。界面活性剤の例は、これらに限定されないが、Triton X-100、Tween 80、タウロデオキシコラート、タウロデオキシコール酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、および/またはラウリル硫酸ナトリウム(SLS)を包含する。

【0467】

Triton X-100は、SHC/HAC酵素または酵素バリエーション(可溶性画分もしくは膜画分/懸濁液形態の)を部分的に精製するために使用されてもよいが、これはまた、生物変換反応において使用されてもよい(例えば、Seitz(2012 PhD thesis - 上に引用されたとおり)、ならびにNeumannおよびSimon(1986 - 上に引用されたとおり)、およびJP2009060799における開示を見よ)。しかしながら、驚くべきことに、本出願人は、具体的に有用な可溶化剤としてSDSを、他の有用性の低い可溶化剤の長いリストから選択し同定した。とりわけ、本出願人は、ホモファルネソールの(-)-アンブロックスへの生物変換反応(EEHが4g/lおよび125g/lの両方にて使用されたとき)に係る反応速度および収率の点で、例としてTriton X-100より顕著に良好な可溶化剤としてSDSを同定した。少なくとも1つのSHC/HAC誘導体酵素について、反応中(約0.005%~0.48%の濃度範囲での)Triton X-100での、そのホモファルネソールから(-)-アンブロックスへの最大生物変換活性は、4g/lでのEEHおよびOD_{650nm}が10での細胞とともにSDS(約0.07%の濃度にて)で得られた活性のほぼ20%でしかないこともある。

【0468】

理論によって拘束されることは望まないが、SHC/HAC酵素または酵素バリエーション(これは膜結合酵素である)をホモファルネソール基質に対してよりアクセス可能にさせるためにSDSが有利なことに宿主細胞膜と相互作用することもあることから、組換え微生物の宿主細胞とのSDSの使用は有利なこともある。加えて、反応混合物中、好適なレベルにてSDSを包含することは、エマルション(水中のホモファルネソール)の特性を改善し、および/またはホモファルネソール基質の宿主細胞内のSHC酵素へのアクセスを、同時に崩壊

10

20

30

40

50

(例として、SHC(WTまたはSHC/HACバリエーション)酵素の変性)を防止しつつ、改善することもある。生物変換反応に使用される可溶化剤(例として、SDS)の濃度は、バイオマス量および基質(EEH)濃度によって影響が与えられる。つまり、可溶化剤(例として、SDS)濃度とバイオマス量と基質(EEH)濃度との間には、ある程度の相互依存性がある。一例として、ホモファルネソール基質の濃度が増大するにつれ、効率的な生物変換反応を起こさせるのに十分な量の生体触媒および可溶化剤(例として、SDS)が要される。例えば、可溶化剤(例として、SDS)濃度が低すぎる場合、準最適なホモファルネソール変換が観察されることもある。他方、例えば、可溶化剤(例として、SDS)濃度が高すぎると、その場合、生体触媒が、無傷の微生物細胞の崩壊および/またはSHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションの変性/不活化のいずれかを通して影響を受けるというリスクが存在することもある。バイオマス量および基質(EEH)濃度という文脈における、SDSの好適な濃度の選択は、当業者の知識の範囲内である。一例として、予測モデルが当業者によって開発されて、好適なSDS、基質(EEH)、およびバイオマス濃度が決定され得る。0.010~0.075%の範囲にあるSDSは、4g/l EEHおよび10.0のOD(650nm)までの生体触媒が使用されたとき、適切なこともある。125g/l EEHが、2x湿重量のバイオマスとともに使用されたとき、調整されたSDS濃度(1.3%)が適切なこともある。しかしながら、種々のSDS/細胞比率値を使用する(-)-アンプロックスへのパーセントEEH変換の調査は、生体触媒とホモファルネソール基質と可溶化剤(例として、SDS)との比率の正しい選択が、SDS濃度範囲およびpH範囲に対してある程度の寛容性を実証する堅固な生物変換反応系の開発を容易にさせることを指し示した。

10

20

【0469】

WT SHC酵素(例として、AacSHC)またはSHC/HACバリエーションに係る生物変換反応の温度は、約25℃から約55℃まで、約25℃から約50℃まで、約30℃から約55℃まで、または約30℃から約50℃まで、約30℃から約60℃まで、例えば約45℃から約60℃まで、例えば約50℃から約60℃まで、例えば約55℃であってもよい。

WT SHC酵素(例として、AacSHC)またはSHC/HACバリエーションに係る生物変換反応のpH範囲は、約5.0から7.0まで、約5から6.5まで、または約5から6まで、より好ましくは約5.6から約6.2まで、さらにいっそう好ましくは約6.0であってもよい。

【0470】

SHC/HAC酵素バリエーションに係る生物変換反応の温度は、約30℃~約55℃、例えば約40℃から約50℃まで、例えば約45℃であってもよい。

30

SHC/HAC酵素バリエーションに係る生物変換反応のpHは、約4.8~6.4、好ましくは約5.2~6.0であってもよい。

【0471】

好ましくは、生物変換反応に使用される可溶化剤は、SDSである。WT SHC酵素(例として、AacSHC)に係る生物変換反応に使用されるSDS濃度は、約4g/lでのEEHおよびOD_{650nm}が10での細胞が使用されたとき、約0.010~0.075%の範囲、好ましくは約0.030%であってもよい。

【0472】

SHC/HAC酵素バリエーションに係る生物変換反応に使用されるSDS濃度は、約4g/lでのEEHおよび10のOD_{650nm}での細胞が使用されたとき、約0.005w/w%~約0.04w/w%、約0.010w/w%から約0.10w/w%まで、約0.0025~0.090%の範囲、好ましくは約0.050%であってもよい。

40

【0473】

生体触媒は、ホモファルネソールが約4g/l EEHのEEH濃度にて反応へロードされているとき、約10.0のOD(650nm)までの反応へロードされていてもよい。

[SDS]/[細胞]比率は、生体触媒:EEH ホモファルネソールの比率が生物変換反応中、約2:1であるとき、約10:1~20:1、好ましくは約15:1~18:1、好ましくは約16:1の範囲にあってもよい。

【0474】

50

SHCバリエーション酵素に係る生物変換反応中のSDS濃度は、ホモファルネソール濃度が約125g/l EEHであり、かつ生体触媒濃度が250g/lである(約175(650nm)のODに対応する)とき、約1~2%の範囲、好ましくは約1.4~1.7%、さらにいっそう好ましくは約1.5%の範囲にあってもよい。

【0475】

生体触媒:EEH ホモファルネソール基質の比率は、約0.5:1~2:1、いくつかの態様において2:1、好ましくは約1:1または0.5:1の範囲にあってもよい。

SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、または80:20の重量比率にあるEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、約2:1、1:1、または約0.5:1、または約0.1:1である。

【0476】

SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEEH:EZHの約100:00;99:01;98:02;97:03;96:04;95:05;94:06;93:07;92:08;91:09;90:10;89:11;88:12;87:13;86:14;85:15;84:16;83:17;82:18;81:19;80:20;79:21;78:22;77:23;76:24;75:25;74:26;73:27;72:28;71:29;70:30;69:31;68:32;67:33;66:34;65:35;64:36;63:37;62:38;61:39;60:40;59:41;58:42;57:43;56:44;55:45;54:46;53:47;52:48;51:49;もしくは約50:50の重量比率にあるEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、約2:1、1:1、または約0.5:1、または約0.1:1である。

【0477】

SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、または約50:50から約100:00まで、もしくは約50:50から約99:01まで、もしくは約60:40から約99:1まで、もしくは約70:30から約95:5まで、もしくは約80:20から約95:5まで、好ましくは80:20の重量比率にあるEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、約2:1、1:1、または約0.5:1、または約0.1:1である。

【0478】

態様において、0.5または0.4または0.3または0.2または0.1の細胞(もしくは生体触媒):EEH比率が使用される。態様において、かかる細胞(または生体触媒):EEH比率が使用されるとき、EEH変換は少なくとも50%、60%、70%、80%、90%、95%、または98%から成る。態様において、かかる細胞(または生体触媒):EEH比率は、100もしくは150もしくは200g/lのEEHが、または250g/lのEEHすら存在するときでさえも、使用される。態様において、かかる細胞(または生体触媒):EEH比率が使用され、かつかかるEEH濃度が使用されるとき、最大で4.5もしくは5.0もしくは5.5gまでのEEHの、または5.9もしくは6.0gさへのEEHの変換が細胞(または生体触媒)のグラムあたりで変換される。かかる結果は実験パートにおいて得られている(例9を見よ)。細胞(生体触媒):EEH比率を参照する文脈において、EEHは、本明細書に記載のとおりホモファルネソールの他の異性体との混合物中に存在していてもよい。我々は、ホモファルネソールの他の異性体が存在することもある場合であっても、存在するEEHの総濃度を参照する。

【0479】

例9が実証するとおり、本明細書に開示および記載のSHCバリエーションを使用するある反応条件下での[細胞]:[EEH]比率は、さらに0.3、0.2、および0.1の値まで低下した。反応時間を、E,E-ホモファルネソール変換がプラトーに達する可能性を見越して、およそ200hまで延長した。およそ98%EEH変換が0.3の[細胞]:[EEH]比率で、およそ84%EEH変換が0.2の[細胞]:[EEH]比率で、およそ59%EEH変換が0.1の[細胞]:[EEH]比率で得られた。0.1の[細胞]:[EEH]比率での反応において達したプラトーは、適用された反応条件下で細胞のグラムあたりおよそ5.9gのE,E-ホモファルネソールを変換する可能性を指し示したが、これは参照生物変換反応よりも約3倍の改善を表す。

【0480】

さらにまた例17において、450g/l EEHおよび0.4の[細胞]:[EEH]比率を使用して

10

20

30

40

50

、完全なEEH変換が72hで得られたことが実証された。完全な変換が24hに、250g/l EEHで、1.0の[細胞]:[EEH]比率にて得られた。これは、適切な量の細胞を使用すると3日間で最大 ≥ 450 g/l EEHを完全変換する可能性を、および試験された条件下で[細胞]:[EEH]比率が少なくとも0.4と同程度に低い場合にこれが可能であったことを指し示した。

【0481】

したがって、態様においてプロセスが提供されるが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、0.4であり、かつEEHの濃度は、450g/lである。

10

【0482】

したがって、態様においてプロセスが提供されるが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、0.1~0.5の範囲、好ましくは0.4であり、かつEEHの濃度は、250g/l~650g/lの範囲、好ましくは450g/lである。

【0483】

別の態様においてプロセスが提供されるが、ここでSHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、またはEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、1であり、かつEEHの濃度は、250g/lである。

20

【0484】

この改善は、あるSHC突然変異(例として、P2突然変異)が参照SHC酵素(例として、SHC#65)中へ導入されたときの総代謝回転数の増大に起因し得る。この増大した総代謝回転数は、新しいSHCバリエーション(例として、SHC#65 P2酵素バリエーション)の、増大した触媒作用の潜在力もしくは増大した安定性、またはその2つの組み合わせの結果でもあり得る。増大した安定性は、新しいSHCバリエーション(例として、SHC#65 P2)のための、温度およびSDS濃度がより有意に低い最適反応条件の結果でもあり得る。

【0485】

SHC/HAC酵素バリエーションに最適な温度は、例えば、約35℃と等しいかまたは約35℃より高くてもよい。例えば、SHC/HAC酵素バリエーションに最適な温度は、約40℃から約50℃まで、例えば約42℃から約48℃まで、または約44℃から約46℃まで及ぶこともある。例えば、SHC/HAC酵素バリエーションの最適温度は、約45℃であってもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションの最適温度にて実行されてもよい。

30

【0486】

SHC/HAC酵素バリエーションに最適なpHは、例えば、約5.4と等しいかまたは約5.4より大きくてもよい。例えば、SHC/HAC酵素バリエーションに最適なpHは、約5.2から約6.0まで、例えば約5.4から約5.8まで、例えば約5.6から約5.8まで及ぶこともある。例えば、SHC/HAC酵素バリエーションの最適pHは、約5.6または約5.8であってもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションの最適pHにて実行されてもよい。

40

【0487】

本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスの反応媒体中のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の最適濃度は、例えば、約0.005w/w%から約0.04w/w%まで、約0.010w/w%から約0.10w/w%までであってもよい。例えば、SDSの最適濃度は、約0.040w/w%から約0.080w/w%まで、例えば、基質(例として、EEHまたはビスEEH)が4g/lにて、OD_{650nm}が10までの細胞とともに使用されたとき、約0.050w/w%であってもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、本明細書に記載のSDSの最適濃度を使

50

用して実行されてもよい。本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスの反応媒体中のドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の最適濃度は、基質(例として、EEHまたはビスEEH)が125 g/lにて、250 g/lの細胞とともに使用されたとき、例えば、約1.0 w/w%から約1.5 w/w%までであってもよい。例えば、SDSの最適濃度は、約1.2 w/w%から約1.4 w/w%まで、例えば、基質(例として、EEHもしくはビスEEH)が125 g/lにて、250 g/lの細胞とともに使用されたときに約1.3 w/w%、または基質(例として、EEHもしくはビスEEH)が125 g/lにて、125 g/lの細胞とともに使用されたときに約0.65 w/w%であってもよい。

【0488】

本明細書に開示の(-)-アンブロックスまたはアンブラオキシドを作製するためのプロセスは、下の例の表15に記されるとおり、使用される特定の酵素にとって、最適温度範囲内、もしくは最適温度にて、および/または最適pH範囲内、もしくは最適pHにて、および/またはSDS最適濃度範囲内、もしくは最適SDS濃度にて、実行されてもよい。

【0489】

いくつかの態様において、(-)-アンブロックスは、ホモファルネソール基質が加えられる生体触媒を使用して産生される。

いくつかの態様において、アンブラオキシドは、ビスホモファルネソール基質が加えられる生体触媒を使用して産生される。

【0490】

知られている手段(例として、蠕動ポンプ、注入シリンジ等)を使用して供給することによって基質を加えることは実行可能である。ホモファルネソールおよびビスホモファルネソールは、油可溶性化合物であってもよく、油型で提供されてもよい。生体触媒(無傷の組換え全細胞などの微生物の細胞、および/または細胞デブリ、および/または固定化酵素)が水性相に存在することを考慮すると、ホモファルネソールまたはビスホモファルネソールが生物変換反応混合物へ加えられたとき、生物変換反応は三相系(水性相、固体相、および油相を含む)と見なされてもよい。この場合はSDSが存在するときでさえ当てはまる。明確化のため、可溶性のWT SHCまたはSHC/HAC酵素バリエーションが生体触媒として使用されたとき、この場合は二相系と見なされる。

【0491】

発酵槽は、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションの遺伝子を発現して活性のあるSHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞を、同じ発酵槽(fermenter vessel)中、生体触媒としての使用に好適である十分なバイオマス濃度まで成長させるのに使用されてもよく、前記発酵槽は、ホモファルネソール供給源を(-)-アンブロックスへ、例えば、副産物(II)、(IV)、および/または(III)の1以上と混和されて変換するのに、あるいはビスホモファルネソール供給源をアンブラオキシドへ、例えば、副産物(XI)、(XII)、および/または(XIII)の1以上と混和されて変換するのに、使用される。本出願内、各分子は、該分子への参照がなされる文脈に応じて、化合物または副産物と呼ばれることもある。大抵、語「副産物」は、該分子が所望されるものではないが、ある条件下で最終産物として許容され得るときに、使用される。副産物が最終産物中に(例として、単独で、または組成物の一部として)包含されている場合、それは副産物よりはむしろ化合物と称されることもある。一例として、副産物は、最終産物もしくは副産物を含む組成物の嗅覚プロファイルに影響をもたらさないかまたは実質的に影響をもたらさない場合、最終産物として許容されてもよい。

【0492】

態様において、本明細書に開示のSHC/HACバリエーションは、EEH基質異性体に対して非常に選択的であり、かつ(-)-アンブロックスの産生に対しても非常に選択的であって、このことにより、さらなる下流処理(濾過/選択的結晶化/蒸留など)が一切実行されなくとも、純粋なEEHを唯一の基質異性体として使用する(-)-アンブロックスおよび検出不能な副産物(IV)の産生が可能になる。

【0493】

10

20

30

40

50

態様において、本明細書に開示のSHC/HACバリエーションは、EEH基質異性体に対して非常に選択的であり、かつ(-)-アンブロッックスの産生に対しても非常に選択的であって、このことにより、純粋なEEHを唯一の基質異性体として使用する(-)-アンブロッックスの産生が可能になる。その上、さらなる下流処理(濾過/選択的結晶化/蒸留など)が一切実行されなくとも、副産物(IV)は検出不能である。

【0494】

態様において、本明細書に開示のSHC/HACバリエーションは、EEH基質異性体に対して非常に選択的であり、かつ(-)-アンブロッックスの産生に対しても非常に選択的であって、このことにより、EEH異性体とEZH異性体とである少なくとも2つの別個の基質異性体を、ならびに以下の混合物: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]の1以上から選択される少なくとも2つの別個の基質異性体を含むホモファルネソール基質異性体の混合物を使用する(-)-アンブロッックスおよび副産物(III)のみの産生が可能になる。かかる態様において、さらなる下流処理(濾過/選択的結晶化/蒸留など)が一切実行されなくとも、副産物(II)および(IV)は検出可能ではない。これは例7(図6)において実証されている。

【0495】

態様において、混合物は、EEHおよびEZHを含む。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。

【0496】

態様において、本明細書に開示のSHC/HACバリエーションは、EEH基質異性体に対して非常に選択的であり、かつ(-)-アンブロッックスの産生に対しても非常に選択的であって、このことにより、EEH異性体とEZH異性体とである少なくとも2つの別個の基質異性体を、ならびに以下の混合物: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]の1以上から選択される少なくとも2つの別個の基質異性体を含むホモファルネソール基質異性体の混合物を使用する(-)-アンブロッックスおよび少なくとも副産物(II)のみの産生が可能になる。

【0497】

態様において、混合物は、EEHおよびEZHを含む。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約50:50から約99:01まで、または約60:40から約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。

【0498】

態様において、本明細書に開示のSHC/HACバリエーションは、EEHに対して非常に選択的であり、かつ(-)-アンブロッックスの産生に対しても非常に選択的であって、このことにより、EEH異性体とEZH異性体とである少なくとも2つの別個の基質異性体を、ならびに以下の混合物: [(3Z,7Z)、(3E,7Z)、(3Z,7E)、および(3E,7E)]、[(3Z,7E)および(3E,7E)]、[(3Z,7E)、(3E,7Z)]、および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]の1以上から選択される少なくとも2つの別個の基質異性体を含むホモファルネソール基質異性体の混合物を使用する、(-)-アンブロッックスおよび少なくとも副産物IIIのみの産生が可能になるが、ここで副産物(II)および(IV)は検出されない。

【0499】

態様において、混合物は、EEHおよびEZHを含む。態様において、混合物は、[(3E,7E)、(3Z,7E)]であって、また[EE:EZ]またはEEH:EZHとも指定される。態様において、この混合物内のEEH:EZHの比率は、約50:50から約99:01まで、または約60:40か

ら約99:1まで、または約70:30から約95:5まで、または約80:20から約95:5まで及んでもよい。

【0500】

当業者は、より高い累積産生力価が、産物除去、基質供給、およびバイオマスの添加または(部分的)置き換えなどの連続プロセスを遂行することによって達成され得ることを理解するであろう。好ましくは、SHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションを含む組換え宿主細胞の存在下での、EEHの(-)-アンブロックスへのまたはビスEEHのアンブラオキシドへの生物変換は、モルパーセント単位で与えられ、かつ採用されるEEHまたはビスEEHのモルに基づき、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100の(-)-アンブロックス収率またはアンブラオキシド収率を生成する;とくに好ましくは、収率は、5と100との間、10と100との間、および100、25と100との間、30と100との間、35と100との間、とりわけ40と100との間、45と100との間、50と100との間、60と100との間、70と100モルパーセントとの間にある。

10

【0501】

SHC/HAC酵素または酵素バリエーションの活性は、molパーセント単位の反応速度(産物の量/(産物の量+残存する出発材料の量)) $\times 100$)を介して定義される。好ましくは、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションの存在下での、EEHの(-)-アンブロックスへのまたはビスEEHのアンブラオキシドへの生物変換は、モルパーセント単位で与えられ、かつ採用されるEEHまたはビスEEHのモルに基づき、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100の(-)-アンブロックス収率またはアンブラオキシド収率を生成する;とくに好ましくは、収率は、5と100との間、10と100との間、20と100との間、25と100との間、30と100との間、35と100との間、とりわけ40と100との間、45と100との間、50と100との間、60と100との間、70と100との間にある。

20

30

【0502】

本発明の好ましい態様において、収率および/または反応速度は、例えば、4、6、8、10、12、16、20、24、36、または48時間という定義された期間(その最中、SHC/HAC酵素もしくは酵素バリエーションをコードするヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞によって、EEHが変換されて(-)-アンブロックスになるか、またはビスEEHが変換されてアンブラオキシドになる)にわたり決定される。さらなるバリエーションにおいて、反応は、例えば、25℃、30℃、40℃、50℃、または60℃という正確に定義された条件下で実行される。とりわけ、収率および/または反応速度は、本発明に従うSHC/HAC酵素または酵素バリエーションによってEEHを(-)-アンブロックスへまたはビスEEHをアンブラオキシドへ変換する反応を24~72時間の期間にわたり35℃にて実行することによって決定される。

40

【0503】

本発明のさらなる態様において、SHC/HAC酵素バリエーションをコードするヌクレオチド配列を含む組換え宿主細胞は、(-)-アンブロックスを与えるホモファルネソールの反応において、またはアンブラオキシドを与えるビスホモファルネソールの反応において、同じ条件下でのWT SHCまたはSHC/HAC誘導体酵素と比較して2-、3-、4-、5-、6-、7-、8-、9-、10-、11-、12-、13-、14-、15-、16-、17-、18-、19-、20-、21-、22

50

-、23-、24-、25-、26-、27-、28-、29-、30-、31-、32-、33-、34-、35-、36-、37-、38-、39-、40-、41-、42-、43-、44-、45-、46-、47-、48-、49-、50-、51-、52-、53-、54-、55-、56-、57-、58-、59-、60-、61-、62-、63-、64-、65-、66-、67-、68-、69-、70-、71-、72-、73-、74-、75-、76-、77-、78-、79-、80-、81-、82-、83-、84-、85-、86-、87-、88-、89-、90-、91-、92-、93-、94-、95-、96-、97-、98-、99-、100-、200-、500-、1000倍、あるいはこれより高い収率および/または反応速度を示すことを特徴とする。ここで条件という用語は、基質濃度、酵素濃度、反応期間、および/または温度などの反応条件に関する。

【0504】

WT/参照SHCまたはSHC/HAC誘導体をコードするヌクレオチド配列を含むE.coliの組換え株においてホモファルネソールから(-)-アンブロックスを作製するための生物変換プロセスの成功した開発は、(-)-アンブロックス産生への低コストかつ産業上経済的なプロセスを用意し得る。

10

【0505】

WT/参照SHCまたはSHC/HAC誘導体をコードするヌクレオチド配列を含むE.coliの組換え株においてビスホモファルネソールからアンブラオキシドを作製するための生物変換プロセスの成功した開発は、アンブラオキシド産生への低コストかつ産業上経済的なプロセスを用意し得る。

【0506】

アンブロックスおよびその使用

20

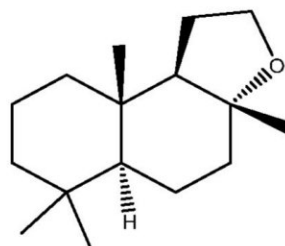
本明細書に記載のプロセスによって作製された反応産物が本明細書にさらに提供される。反応産物は、例えば、(-)-アンブロックスと、1以上のさらなる化合物、例えば、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物のうち1以上とを含んでもよく、本質的にこれらからなってもよく、またはこれらからなってもよい。

【0507】

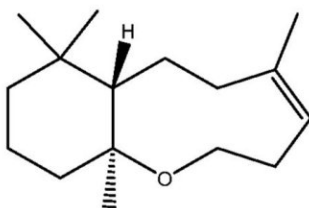
本明細書に使用されるとき、用語「アンブロックス」は、下の式(I)で表される(-)-アンブロックス、ならびに異性体的に純粋な形態の、あるいは以下の式(II)、(III)、および/または(IV)で表される分子の1以上との混合物の、(-)-アンブロックスを包含する。

【化2】

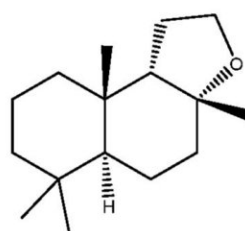
30



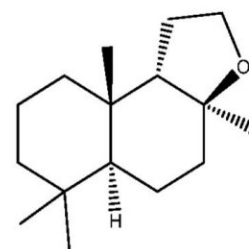
(I)



(II)



(III)



(IV).

40

【0508】

式(I)、(II)、(III)、および(IV)で表される反応産物への命名法は下に記される。

50

表 13. 式 (I)、(II)、(III)、および (IV) で表される反応産物への命名法。

【表 13 - 1】

化合物	記載	名称および構造
(I)	(-)-アンブロックス	 <chem>(3aR,5aS,9aS,9bR)-3a,6,6,9a-tetramethyldecalidofuran [2,1-b]</chem>
(II)	大員環	 <chem>(7aS,11aS,Z)-5,8,8,11a-tetramethyl-2,3,6,7,7a,8,9,10,11,11a-decahydrobenzo[b]oxonine</chem>

10

【0509】

20

【表 13 - 2】

(III)	9b-エピー アンブロックス	 <chem>(3aR,5aS,9aS,9bS)-3a,6,6,9a-tetramethyldecalidofuran [2,1-b]</chem>
(IV)	Escher <i>et al</i> (1990)	 <chem>(3aS,5aS,9aS,9bS)-3a,6,6,9a-tetramethyldecalidofuran [2,1-b]</chem>

30

【0510】

40

(-)-アンブロックスは商業上、アンブロックス(Ambrox)(Firmenich)、アンブロキサン(Ambroxan)(Henkel)、アンブロフィクス(Ambrofix)(Givaudan)、アンベルリン(Amberlyn)(Quest)、セタロックス・レーヴォ(Cetalox Laevo)(Firmenich)、アンバーモル(Ambermor)(Aromor)、および/またはノルアンブレノリド・エーテル(Norambrenolide Ether)(Pacific)として知られている。

【0511】

(-)-アンブロックスは産業上重要な芳香化合物であって、フレグランス産業において長い間使用されてきた。(-)-アンブロックスからの特別な所望される感覚的な恩恵は、(+)異性体よりむしろ、(-)異性体から来る。(-)異性体のにおいては、ムスク様、ウッディ(woody)、ウォーム(warm)、またはアンバー(ambery)として記載されるが、一方(+)-アン

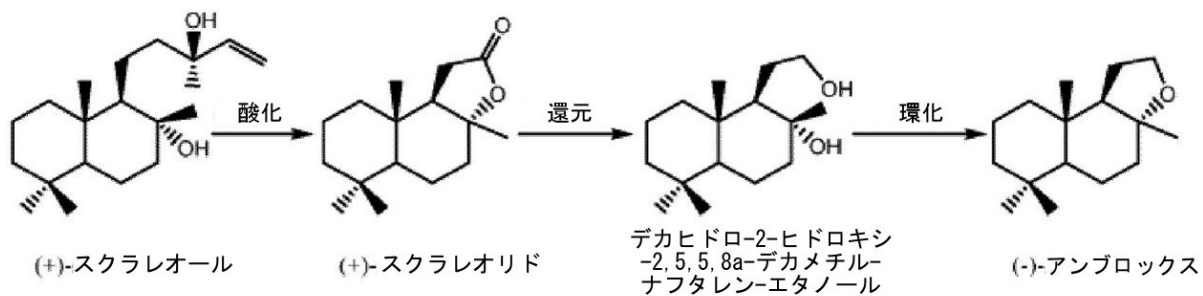
50

ブロッक्सの鏡像異性体は相対的に弱いにおいノート(note)を有する。アンブロックス様産物のにおいおよびにおい閾値もまた、異なる。様々な(-)-アンブロックス富化材料は商業的に入手可能ではあるものの、高度に富化された(-)-アンブロックス材料、理想的には純粋な(-)-アンブロックスを産生することが所望されている。本明細書に記載のプロセスは、式(I)で表される(-)-アンブロックスを、単独で、あるいは上の式(II)、(III)、および/または(IV)に示される化合物などの副産物との混合物で、作製してもよい。

【0512】

(-)-アンブロックスは、下に記載されるとおりの産生プロセスに従ってスクラレオリドから産生され得る。スクラレオールは、天然の植物クラリーセージから抽出された産物である。しかしながら、天然の出発材料がこのプロセスに使用されるため多段階反応を伴い、その操作は回りくどく、出発材料の供給の分量および安定性が常に満足のいくものではないこともあり、クロム酸または過マンガン酸塩などの酸化剤が(+)-スクラレオールの酸化的分解ステップに使用されるため反応が低環境負荷型ではないこともあるという潜在的な問題がある。

【化3】



【0513】

(-)-アンブロックスはまた、種々のルートを使用し、ホモファルネソールからも合成されてもよい。一例として、ホモファルネソールは、ネロリドールを臭素化、シアン化、および加水分解することでホモファルネシル酸が与えられ、還元を受けることによって得ることができる。代替的に、ホモファルネソールは、ファルネソール、ファルネシル塩化物、ベータ-ファルネセン、または他の基質から得られてもよい。

【0514】

本明細書に記載のプロセスは、式(I)で表される(-)-アンブロックスを、単独で、あるいは上の式(II)、(III)、および/または(IV)に示される化合物などの副産物との混合物で、作製してもよい。例えば、式(I)で表される他の立体異性体も、本明細書に記載のプロセスによって作製されてもよい。本明細書に以前解説されたとおり、態様においてEEホモファルネソールのみが存在するとき、本明細書に記載のプロセスにより、副産物(IV)がまったくないかまたは副産物(IV)が検出不能である(-)-アンブロックスの産生が可能になるが、このことは、本明細書に記載のSHC/HAC酵素バリエーションに対する高い基質特異性および産物選択性を指し示す。

【0515】

したがって、本明細書に記載のプロセス(それらすべての態様を包含する)によって得られたかまたはそれによって得ることができる、式(I)で表される化合物または式(I)で表される化合物を含む組成物が本明細書に提供される。

【0516】

ある態様において、ホモファルネソール(例として、EEH)のすべてが、(-)-アンブロックスまたは反応の副産物へ変換されるのではない。したがって、本明細書に記載の組成物、例えば、本明細書に記載のプロセスによって得られた組成物またはそれによって得ることができる組成物は、ホモファルネソール(例として、EEH、例えば、式(I)で表される化合物、および/または式(II)、(III)、および/または(IV)で表される化合物に加えて)を含んでいてもよい。いずれの残存するホモファルネソールも、(-)-アンブロックス産物がホ

モファルネソールを含まないように、他の反応産物から分離されてもよい。他の態様において、ホモファルネソール出発材料のすべてが、本明細書に記載のプロセスによって式(I)で表される(-)-アンブロックスまたは反応の副産物へ変換される。

【0517】

したがって、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、式(IV)で表される化合物、ホモファルネソール出発材料(例として、EEH)、および式(I)で表される化合物の他の立体異性体のうち1以上を含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。

【0518】

例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物と、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物うち1以上とを含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。

【0519】

例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物と、式(II)で表される化合物、および式(III)で表される化合物うち1以上とを含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。

したがって、態様において、生物変換反応中にEEホモファルネソール異性体のみが存在するとき、単離/精製/下流処理ステップが一切実行されていなくとも、式(IV)で表される化合物は検出不能である。

【0520】

例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物と式(III)で表される化合物とを含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。

したがって、態様において、EE/EZホモファルネソール異性体が生物変換反応中に存在するとき、精製/下流処理ステップが一切実行されていなくとも、式(II)および(IV)で表される化合物は検出不能である。

【0521】

したがって、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%と等しいかまたは約50wt%より多くの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量に基づき、約55wt%と等しいかまたは約55wt%より多くの、または約60wt%と等しいかまたは約60wt%より多くの、または約65wt%と等しいかまたは約65wt%より多くの、または約70wt%と等しいかまたは約70wt%より多くの、または約75wt%と等しいかまたは約75wt%より多くの、または約80wt%と等しいかまたは約80wt%より多くの、または約85wt%と等しいかまたは約85wt%より多くの、または約90wt%と等しいかまたは約90wt%より多くの、または約95wt%と等しいかまたは約95wt%より多くの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。本明細書に記載の組成物は、例えば、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量に基づき、約100wt%と等しいかもしくは約100wt%未満の式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、混合物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量に基づき、約99wt%と等しいかしくは約99wt%未満の、または約98wt%と等しいかしくは約98wt%未満の、または約97wt%と等しいかしくは約97wt%未満の式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%から約100wt%まで、または約60wt%から約99wt%まで、または約70wt%から約98wt%まで、または約80wt%から約97wt%まで、または約90wt%から約97wt%までの式(I)で表される化合物を含んでいて

もよい。

【0522】

本明細書に記載の組成物中の、式(I)で表される化合物:式(II)で表される化合物、式(I)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量の重量比率は、例えば、約60:40から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(I)で表される化合物:式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約99:1まで、または約70:30から約99:1まで、または約75:25から約99:1まで、または約80:20から約99:1まで、または約85:15から約99:1まで、または約90:10から約99:1まで、または約95:5から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(I)で表される化合物:式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約98:2まで、または約70:30から約97:3まで、または約75:25から約96:4まで、または約80:20から約95:5まで、または約85:15から約90:10まで及ぶこともある。

10

【0523】

したがって、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%と等しいかまたは約50wt%より多くの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約55wt%と等しいかまたは約55wt%より多くの、または約60wt%と等しいかまたは約60wt%より多くの、または約65wt%と等しいかまたは約65wt%より多くの、または約70wt%と等しいかまたは約70wt%より多くの、または約75wt%と等しいかまたは約75wt%より多くの、または約80wt%と等しいかまたは約80wt%より多くの、または約85wt%と等しいかまたは約85wt%より多くの、または約90wt%と等しいかまたは約90wt%より多くの、または約95wt%と等しいかまたは約95wt%より多くの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。本明細書に記載の組成物は、例えば、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約100wt%と等しいかもしくは約100wt%未満の式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、混合物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約99wt%と等しいかもしくは約99wt%未満の、または約98wt%と等しいかもしくは約98wt%未満の、または約97wt%と等しいかもしくは約97wt%未満の式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%から約100wt%まで、または約60wt%から約99wt%まで、または約70wt%から約98wt%まで、または約80wt%から約97wt%まで、または約90wt%から約97wt%までの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。

20

30

【0524】

本明細書に記載の組成物中の、式(I)で表される化合物:式(II)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量の重量比率は、例えば、約60:40から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(I)で表される化合物:式(II)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約99:1まで、または約70:30から約99:1まで、または約75:25から約99:1まで、または約80:20から約99:1まで、または約85:15から約99:1まで、または約90:10から約99:1まで、または約95:5から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(I)で表される化合物:式(II)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約98:2まで、または約70:30から約97:3まで、または約75:25から約96:4まで、または約80:20から約95:5まで、または約85:15から約90:10まで及ぶこともある。

40

【0525】

したがって、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%と等しいかまたは約50wt%より多くの式(I)で

50

表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約55wt%と等しいかまたは約55wt%より多くの、または約60wt%と等しいかまたは約60wt%より多くの、または約65wt%と等しいかまたは約65wt%より多くの、または約70wt%と等しいかまたは約70wt%より多くの、または約75wt%と等しいかまたは約75wt%より多くの、または約80wt%と等しいかまたは約80wt%より多くの、または約85wt%と等しいかまたは約85wt%より多くの、または約90wt%と等しいかまたは約90wt%より多くの、または約95wt%と等しいかまたは約95wt%より多くの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。本明細書に記載の組成物は、例えば、式(I)で表される化合物および式(II)で表される化合物の総重量に基づき、約100wt%と等しいかもしくは約100wt%未満の式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、混合物は、式(I)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約99wt%と等しいかもしくは約99wt%未満の、または約98wt%と等しいかもしくは約98wt%未満の、または約97wt%と等しいかもしくは約97wt%未満の式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(I)で表される化合物および式(III)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%から約100wt%まで、または約60wt%から約99wt%まで、または約70wt%から約98wt%まで、または約80wt%から約97wt%まで、または約90wt%から約97wt%までの式(I)で表される化合物を含んでいてもよい。

10

【0526】

本明細書に記載の組成物中の、式(I)で表される化合物:式(III)で表される化合物の総重量の重量比率は、例えば、約60:40から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(I)で表される化合物:式(III)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約99:1まで、または約70:30から約99:1まで、または約75:25から約99:1まで、または約80:20から約99:1まで、または約85:15から約99:1まで、または約90:10から約99:1まで、または約95:5から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(I)で表される化合物:式(III)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約98:2まで、または約70:30から約97:3まで、または約75:25から約96:4まで、または約80:20から約95:5まで、または約85:15から約90:10まで及ぶこともある。

20

【0527】

本明細書に記載の組成物中の、式(I)で表される化合物:ホモファルネソール(例として、EEH)の重量比率は、例えば、約90:10から約100:0まで及ぶこともある。例えば、本明細書に記載の組成物中の式(I)で表される化合物:ホモファルネソール(例として、EEH)の重量比率は、約92:8から約100:0まで、または約94:6から約100:0まで、または約95:5から約100:0まで、または約96:4から約99.5:0.5まで、または約97:3から約99.0:1.0まで、または約98:2から約99.0:1.0まで及ぶこともある。

30

【0528】

立体異性体の混合物中の、式(I)で表される化合物、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物の量は、例えば、ガスクロマトグラフィーによって定量化されてもよく、および/または分光法によって同定されてもよい。

【0529】

本明細書に記載のプロセスによって(例として、SHC/HAC酵素またはそのバリエーション、および任意に、組換え宿主細胞を使用して)合成されるとおりの(-)-アンブロックスは、例えば、固体形態であってもよい。固体形態はアモルファス形態であっても、または結晶形態であってもよい。

40

【0530】

本明細書に記載の方法によって(例として、SHC/HAC酵素またはそのバリエーション、および任意に、組換え宿主細胞を使用して)産生される(-)-アンブロックスは、非水混和性溶媒を使用する蒸気(steam)抽出/蒸留または有機溶媒抽出(水性相中に留まっている生体触媒から反応産物および未反応基質を分離するため)、これに続く溶媒の蒸発を受け、ガスクロマトグラフ(GC)分析によって決定されるとおり粗反応産物を得ることによって

50

単離されてもよい。蒸気抽出/蒸留および有機溶媒抽出の方法は、当業者に知られている。

【0531】

(-)-アンブロックスは、結晶としてまたはアモルファス形態で固体相中に存在し、濾過(例として、ベルトフィルターもしくはプレスフィルターもしくは適切なメッシュサイズのいずれかのフィルターを使用する)を用いて、残存する固体相(細胞材料またはそのデブリ)および液体相(反応混合物(例として、未反応ホモファルネソールおよび/または副生成物(II)および/またはIII)および/またはIV)および/または反応緩衝液)の)から分離され得る。代替的に、(-)-アンブロックスを含んでいてもよい反応混合物の固体相は、例えば遠心分離によって、液体相から分離され得る。

10

【0532】

(-)-アンブロックスは、水混和性溶媒(例えば、エタノール)または非水混和性溶媒(例えば、トルエン)を使用して、固体相(例として、細胞材料、デブリ、および(-)-アンブロックス結晶)から抽出されてもよい。代替的に、その結果得られる(-)-アンブロックスは、溶媒の(例として、水混和性溶媒と非水混和性溶媒との)混合物を使用し、固相の反応混合物から抽出されてもよい。

【0533】

(-)-アンブロックスはまた、全反応混合物からも抽出され得るが、ここでそれは非水混和性溶媒(例えば、トルエン)で抽出される。

【0534】

(-)-アンブロックスの抽出および/または選択的結晶化における使用に好適な、好適な水混和性および非水混和性の有機溶媒の例は、これらに限定されないが、脂肪族炭化水素、好ましくは5~8個の炭素原子を有するもの、たとえば、ペンタン、シクロペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、オクタン、またはシクロオクタン、ハロゲン化脂肪族炭化水素、好ましくは1個もしくは2個の炭素原子を有するもの、たとえば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、またはテトラクロロエタン、芳香族炭化水素、たとえば、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、またはジクロロベンゼン、脂肪族の非環式および環状のエーテルあるいはアルコール、好ましくは4~8個の炭素原子を有するもの、たとえば、エタノール、イソプロパノール、ジエチルエーテル、メチルtert.-ブチルエーテル、エチルtert.-ブチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、テトラヒドロフラン、またはエステル、たとえば、酢酸エチルもしくは酢酸n-ブチル、またはケトン、たとえば、メチルイソブチルケトン、またはジオキサン、またはこれらの混合物を包含する。とくに好ましく使用される溶媒は、上述したヘプタン、メチルtert.-ブチルエーテル(また、MTBE、tert.-ブチルメチルエーテル、三級ブチルメチルエーテル、およびtBMEとしても知られている)、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、および/またはそれらの混合物である。好ましくは、エタノールなどの水混和性溶媒は、固相の反応混合物からの(-)-アンブロックスの抽出のために使用される。エタノールは扱いが容易であり、非毒性かつ低環境負荷型であるので、エタノールの使用が有利である。

20

30

【0535】

一例として、その結果得られる(-)-アンブロックスは、非水混和性溶媒(例えば、トルエン)などの有機溶媒を使用し、全反応混合物から抽出されてもよい。代替的に、その結果得られる(-)-アンブロックスは、水混和性溶媒(例えば、エタノール)または非水混和性溶媒(例えば、トルエン)を使用し、固相の反応混合物(例えば、遠心分離または濾過によって得られた)から抽出されてもよい。代替的に、その結果得られる(-)-アンブロックスは、溶媒の混合物を使用し、固体相の反応混合物から抽出されてもよい。さらなる一例として、(-)-アンブロックスは、結晶としてまたはアモルファス形態で固相中に存在し、また濾過も用いて、残存する固相(細胞材料またはそのデブリ)および液相から分離され得る。さらなる一例として、(-)-アンブロックスの融点(ほぼ75℃)を上回る温度にて、(-)-アンブロックスは水性相の上に油層を形成することもあるが、この油層は除去されて収集さ

40

50

れ得る。油層が除去された後の(-)-アンブロックスの完全回収を確かにするために、有機溶媒は、バイオマス中またはバイオマス上またはバイオマス周囲に含有されるいずれの残りの(-)-アンブロックスを抽出するため、バイオマスを含有する水性相へ加えられてもよい。有機層は、その全体がさらに処理されて(-)-アンブロックスを単離し精製する前に、油層と組み合わせられ得る。

【0536】

(-)-アンブロックスは、さらに選択的に結晶化されることで、副産物(II)、(IV)、および(III)と、いずれの未反応ホモファルネソール基質とが最終(-)-アンブロックス産物から除去されてもよい。用語「選択的結晶化」は、化合物(II)、(III)、および(IV)は結晶化溶媒中に溶解したままであるのに、(-)-アンブロックスが溶媒から、単離結晶材料が(-)-アンブロックス産物のみを含有する(またはそれが、他の化合物(II)、(III)、または(IV)のいずれかを含有するなら、その場合これらは嗅覚的に許容し得る量でしか存在しない)程度まで結晶化させられるところの処理ステップを指す。

10

【0537】

(-)-アンブロックスは、例えば、副産物(II)、(III)、および(IV)がなくてもよく、または実質的にこれらがなくてもよい。選択的結晶化ステップは、エタノールなどの水混和性溶媒または同種のものを使用してもよい。(-)-アンブロックスの選択的結晶化は、未反応ホモファルネソール基質の存在による影響が、また(-)-アンブロックス:他の検出可能な副産物(II)、(III)、および/または(IV)の比率による影響も、与えられることがある。ホモファルネソール基質の(-)-アンブロックスへの変換が10%しか得られなかったとしても、(-)-アンブロックスの選択的結晶化は依然として実行可能である。

20

【0538】

副産物(II)および/または(IV)が産生され得る事象において、(-)-アンブロックスは、さらに選択的に結晶化されることで、副産物(III)およびいずれかの未反応ホモファルネソール基質のすべてまたは実質的にすべてが最終(-)-アンブロックス産物から除去されてもよい。用語「選択的結晶化」は、化合物(III)は結晶化溶媒中に溶解したままであるのに、(-)-アンブロックスが溶媒から、単離結晶材料が(-)-アンブロックス産物のみを含有する(またはそれが化合物(III)を含有するなら、その場合それは嗅覚的に許容し得る量でしか存在しない)程度まで結晶化させられるところの処理ステップを指す。(-)-アンブロックスは、例えば、副産物(III)がなくてもよく、または実質的にこれらがなくてもよい。選択的結晶化ステップは、エタノールなどの水混和性溶媒または同種のものを使用してもよい。(-)-アンブロックスの選択的結晶化は、未反応ホモファルネソール基質の存在による影響が、また(-)-アンブロックス:他の検出可能な副産物(III)の比率による影響も、与えられることがある。ホモファルネソール基質の(-)-アンブロックスへの変換が10%しか得られなかったとしても、(-)-アンブロックスの選択的結晶化は依然として実行可能である。

30

【0539】

最終(-)-アンブロックス産物の嗅覚的純度(olfactive purity)は、水中10%エタノール抽出物を使用して、または結晶材料を試験することによって、決定されてもよい。最終(-)-アンブロックス産物は、その嗅覚的純度、品質、およびその官能プロファイルについて、市販の(-)-アンブロックス産物参照に対し試験される。(-)-アンブロックス材料はまた、材料がその感覚刺激性プロファイルに関する仕様を満たすか決定するために、専門家による応用研究においても試験される。

40

【0540】

用語「嗅覚的に純粋な」は、(-)-アンブロックスに関して使用されるとき、(-)-アンブロックスには、化合物(II)、(III)、(IV)も、反応混合物中に見出されるいずれの他の材料もないこと、またはかかる化合物もしくは材料が存在するはずであるなら、それらは、その用語が本明細書に定義されるとおり嗅覚的に許容し得る量で存在すること、を意味することが意図される。

【0541】

50

本発明の態様において、嗅覚的に純粋な形態にある(-)-アンブロックスは、5重量%未満の化合物(II)、(III)、および/または(IV)のいずれかを含有する。

本発明の態様において、嗅覚的に純粋な形態にある(-)-アンブロックスは、反応混合物中に見出される化合物(II)、(III)、(IV)のいずれか、および/またはいずれか他の材料の5重量%未満を含有する。

【0542】

より具体的な態様においては、嗅覚的に純粋な形態にある(-)-アンブロックスは、4重量%未満、3重量%未満、2重量%未満、1重量%未満、0.9重量%未満、0.8重量%未満、0.7重量%未満、0.6重量%未満、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満、もしくは0.05重量%未満の、化合物(II)、(III)、お

10

【0543】

より具体的な態様においては、嗅覚的に純粋な形態にある(-)-アンブロックスは、4重量%未満、3重量%未満、2重量%未満、1重量%未満、0.9重量%未満、0.8重量%未満、0.7重量%未満、0.6重量%未満、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満、もしくは0.05重量%未満の、化合物(II)、(III)、(IV)、および/または反応混合物中に見出されるいずれか他の材料の各々を含有する。

【0544】

より具体的な態様においては、嗅覚的に純粋な形態にある(-)-アンブロックスは、4重量%未満、3重量%未満、2重量%未満、1重量%未満、0.9重量%未満、0.8重量%未満、0.7重量%未満、0.6重量%未満、0.5重量%未満、0.4重量%未満、0.3重量%未満、0.2重量%未満、0.1重量%未満、もしくは0.05重量%未満であるが0%超の、化合物(II)、(III)、(IV)、および/または反応混合物中に見出されるいずれか他の材料の各々を含有する。

20

【0545】

選択的結晶化による化合物(II)、(III)、および/または(IV)の混合物からの、選択的結晶化による(-)-アンブロックスの分離の質は、分離される混合物の組成による影響が与えられることもある。より具体的に、化合物(II)、(III)、および/または(IV)の混合物からの、結晶化による(-)-アンブロックスの分離の質は、混合物中の(-)-アンブロックス:他の化合物(II)、(III)、および(IV)の比率が、70:30、より具体的には80:20、より具体的には90:10、なおもより具体的には95:5、より具体的にはなおも97:3より大きかったときに改善された。

30

【0546】

化合物(II)、(III)、(IV)、および/または反応混合物中に見出されるいずれか他の材料の混合物からの、選択的結晶化による(-)-アンブロックスの分離の質は、分離される混合物の組成による影響が与えられることもある。より具体的に、化合物(II)、(III)、(IV)、および/または反応混合物中に見出されるいずれか他の材料の混合物からの、結晶化による(-)-アンブロックスの分離の質は、混合物中の(-)-アンブロックス:他の化合物(II)、(III)、(IV)、および反応混合物中に見出されるいずれか他の材料の比率が、70:30、より具体的には80:20、より具体的には90:10、なおもより具体的には95:5、より具体的にはなおも97:3より大きかったときに、改善された。

40

【0547】

さらにまた、結晶化による(-)-アンブロックスの分離の質は、分離される混合物中に存在する未反応ホモファルネソールの量による影響が与えられることもある。より具体的に、分離の質は、未反応ホモファルネソールのレベルが、(-)-アンブロックスが結晶化される混合物の重量に基づき、30重量%未満、より具体的には20wt%未満、より具体的には10重量%未満、より具体的にはなおも5wt%未満、なおもより具体的には3重量%未満、なおもより具体的には2重量%未満、より具体的にはなおも1重量%未満であるときに、改善される。

【0548】

50

好ましくは、本発明の生物変換プロセスに採用される試薬および反応条件は、反応が、ホモファルネソールの100%変換でまたは実質的にそう進み、よって生物変換媒体中に未反応ホモファルネソールが一切残らないようなものである。しかしながら、未反応ホモファルネソールが存在する場合、経済的には不利ではあるが、それは(-)-アンブロックスおよび他の副産物から、例えば蒸留、または(-)-アンブロックスの結晶を適切な溶媒で洗浄することによって、分離され得る。

【0549】

結果的に、本発明の具体的な態様において、(-)-アンブロックスを、化合物(II)、(III)、および(IV)の1以上を含む混合物から単離および精製する方法が提供されるが、その混合物はホモファルネソールがないかまたは実質的にない。

10

【0550】

より具体的な態様において、(-)-アンブロックスの、化合物(II)、(III)、および(IV)の1以上を含みかつホモファルネソールがないかまたは実質的にない混合物からの単離および精製は、(-)-アンブロックスの選択的結晶化によって達成される。

【0551】

本発明の方法に従って得られる(-)-アンブロックスは、嗅覚的に純粋な形態で得られる。嗅覚的に純粋な(-)-アンブロックスは、本発明の別の側面を形成する。

【0552】

用語「単離された」は、本明細書に使用されるとき、(-)-アンブロックスなどの生物変換産物を伴う構成要素から分離または精製された前記生物変換産物を指す。ある実体が天然の起源とする供給源とは異なる細胞系において産生されるその実体は「単離された」ものである。なぜなら、前記細胞系には、その実体を天然に伴う構成要素が必ずしもないからであろう。単離または純度の度合いは、いずれの適切な方法、例として、ガスクロマトグラフィー(GC)分析、HPLC分析、またはNMR分析によっても測定され得る。

20

【0553】

いくつかの態様において、最終産物((-)-アンブロックス)は、均一(例として、少なくとも70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、もしくは89.5%純粋、または90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは99.5%純粋)になるまで単離され精製される。

30

【0554】

望ましくは、産生される(-)-アンブロックスの量は、約20g/lから約200g/lまで、または100~200g/l、好ましくは約125g/l、または150g/l、または約188g/l、または約200g/l、または約250g/l、または約300g/l、または約350g/l、または約400g/l、または約450g/lなど、約1mg/lから約20,000mg/l(20g/l)まで、またはこれより多くてもよい。

【0555】

望ましくは、産生される(-)-アンブロックスの量は、約20g/lから約200g/lまで、または100~200g/l、好ましくは約125g/l、または150g/l、または約188g/l、または約200g/l、または約250g/l、または約300g/l、または約350g/l、または約400g/l、または約450g/lなど、約1mg/lから約20,000mg/l(20g/l)まで、またはこれより多くてもよい。

40

【0556】

少なくとも125g/l(-)-アンブロックスは、SHC/HAC酵素または酵素バリエーションを産生する組換えE.coli宿主細胞を使用する生物変換反応において、約2日間にわたり産生されてもよい。攪拌(stirring)効率が系の唯一の限界であり得るところ、もし効率的な混合が達成されれば、生物変換を188g/l EEH以上(例として、400g/lまたは450g/l)に行うことが可能である。加えて、改善された活性および/または選択性を(例として、さらに改善された活性をもつSHCバリエーションの点で、もしくは増大したSHC酵素産生の点で、および/または基質選択性もしくは産物選択性の点で)もつ生体触媒は、バイオマ

50

スをより少なく使用するかまたは基質濃度を増大させて使用して(これらの使用は混合効率に関して有利である)、産生力を改善または維持することもある。

【0557】

例えば、約1～約100mg/l、約30～約100mg/l、約50～約200mg/l、約100～約500mg/l、約100～約1,000mg/l、約250～約5,000mg/l、約1,000(1g/l)～約15,000mg/l(15g/l)、または約2,000(2g/l)～約10,000mg/l(10g/l)、または約2,000(2g/l)～約25,000mg/l(25g/l)、または約2,000(2g/l)～約25,000mg/l(25g/l)、26,000mg/l(26g/l)、27,000mg/l(27g/l)、28,000mg/l(28g/l)、29,000mg/l(29g/l)、30,000mg/l(30g/l)、40g/l、50g/l、60g/l、70g/l、80g/l、90g/l、100g/l、110g/l、120g/l、125g/l、130g/l、140g/l、150g/l、160g/l、170g/l、180g/l、190g/l、または200g/l、または300g/l、または400g/l、または450g/l、または500g/lの(-)-アンブロックスが産生される。

10

【0558】

好ましくは、少なくとも100g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

好ましくは、約150g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。好ましくは、約200g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

【0559】

好ましくは、約250g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

20

好ましくは、約300g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

【0560】

好ましくは、約400g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

好ましくは、約450g/lの濃度での(-)-アンブロックスは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

【0561】

本開示に従うホモファルネソールの(-)-アンブロックスへの生物変換は、(-)-アンブロックスを主たる化合物として産生するが、(-)-アンブロックス以外の化合物もまた産生することもあり、これらは心地良い嗅覚ノート(olfactive notes)を生物変換混合物へ付与してもまたは付与しなくてもよく、そのため積極的または消極的なやり方で(-)-アンブロックス最終産物の官能特徴へ寄与することもある。結果的に、官能分析は、熟練した専門家(例として、調香師)によって利用され十分に確立された官能試験を使用し、試験が、化学的に関係のある産物が参照産物と比べて嗅覚的に関係のある最終産物でもあるかを決定することに役立ち得るように、実行される。(-)-アンブロックスからの1以上の副産物化合物の除去は、除去された化合物が実際にそれ自体無臭の化合物であったとしても、(-)-アンブロックスを含む反応産物の混合物のにおいを改善し得る。つまり、(-)-アンブロックスのにおい増強は、化合物II、III、およびIVの不在下で観察されることもある。

30

40

【0562】

(-)-アンブロックスの様々な用途は、これらに限定されないが、以下：アンブロックス(Firmenich)、アンブロキサン(Henkel)、アンブロフィクス(Givaudan)、アンベルリン(Quest)、セタロックス・レーヴォ(Firmenich)、アンバーモール(Aromor)、およびノルアンブレノリド・エーテル(Pacific)という製品を包含する、目下利用可能なアンブロックス成分が商業的に使用されるところの本質的にすべての産物を包含する、布の仕上げ剤(fabric care)、洗面用具(toiletries)、美容用品(beauty care)および洗浄製品、洗剤製品、ならびに石鹸製品などの、高級(fine)フレグランスまたは消費者向製品を包含するがこれらに限定されない。

【0563】

50

よって、本明細書に記載のプロセスによって得られたかもしくはそれによって得ることができる(-)-アンブロックスの、フレグランスまたは化粧料または消費者向製品の一部としての使用が本明細書にさらに提供される。本明細書に記載のプロセスによって得られたかまたはそれによって得ることができる(-)-アンブロックスを含む製品もまた、本明細書に提供される。製品は、例えば、フレグランスまたは化粧料または消費者向製品であってもよい。

【0564】

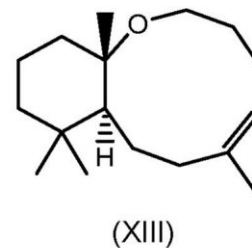
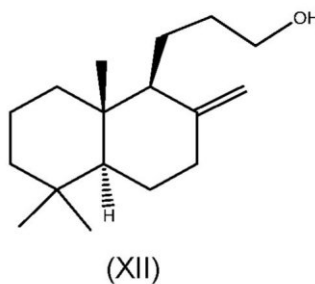
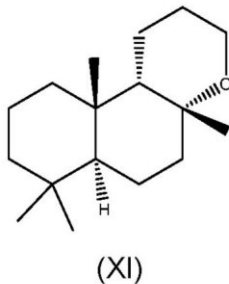
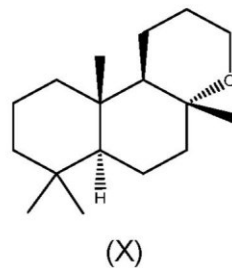
アンブラオキシドおよびその使用

本明細書に記載のプロセスによって作製された反応産物が本明細書にさらに提供される。反応産物は、例えば、アンブラオキシドと、1以上のさらなる化合物、例えば、式(II)で表される化合物、式(III)で表される化合物、および式(IV)で表される化合物のうち1以上とを含んでいてもよく、本質的にこれらからなっているいてもよく、またはこれらからなっているいてもよい。

【0565】

本明細書に使用されるとき、用語「アンブラオキシド」は、下の式(X)で表されるアンブラオキシド、ならびに異性体的に純粋な形態の、あるいは式(XI)、(XII)、および/または(XIII)で表される分子の1以上との混合物の、式(X)で表されるアンブラオキシドを包含する。

【化4】



【0566】

式(X)、(XI)、(XII)、および(XIII)で表される反応産物への命名法は、下に記される。

表14. 式(X)、(XI)、(XII)、および(XIII)で表される反応産物への命名法。

10

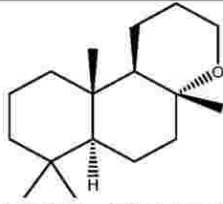
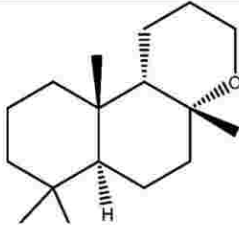
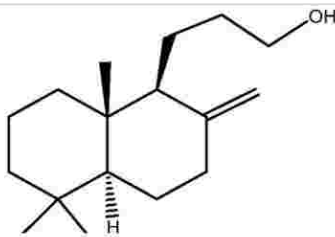
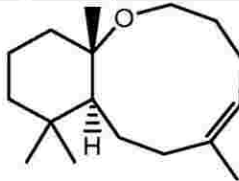
20

30

40

50

【表 1 4】

化合物	名称および構造
(X)	 (4aR,6aS,10aS,10bR)-4a,7,7,10a-テトラメチルドデカヒドロ-1H-ベンゾ[f]クロメン](アンブラオキシド)
(XI)	 [(4aR,6aS,10aS,10bS)-4a,7,7,10a-テトラメチルドデカヒドロ-1H-ベンゾ[f]クロメン]
(XII)	 [3-((1S,4aS,8aS)-5,5,8a-トリメチル-2-メチレンデカヒドロナフタレン-1-イル)プロパン-1-オール]
(XIII)	 [(8aS,12aS,Z)-6,9,9,12a-テトラメチル-3,4,7,8,8a,9,10,11,12,12a-デカヒドロ-2H-ベンゾ[b]オキセシン]

10

20

30

【0567】

アンブラオキシドは、Bolster et al., Tetrahedron, 2002, 58(26), pages 5275-5285に記載されるとおり(+)-ラリキソール(Larixol)から産生され得る。しかしながら、アンブラオキシドを産生するための代替方法または改善方法を提供することが所望されている。

40

【0568】

本明細書に記載のプロセスは、式(X)で表されるアンブラオキシドを、単独で、あるいは式(XI)、(XII)、および/または(XIII)に示される化合物などの副産物との混合物で、作製してもよい。例えば、式(X)で表される他の立体異性体も、本明細書に記載のプロセスによって作製されてもよい。

【0569】

したがって、本明細書に記載のプロセス(それらすべての態様を包含する)によって得られたかもしくはそれによって得ることができる、式(X)で表される化合物、または式(X)で表される化合物を含む組成物が本明細書に提供される。

50

【0570】

ある態様において、ビスホモファルネソール(例として、ビスEEH)のすべてが、アンブラオキシドまたは反応の副産物へ変換されるのではない。したがって、本明細書に記載の組成物、例えば、本明細書に記載のプロセスによって得られた組成物またはそれによって得ることができる組成物は、ビスホモファルネソール(例として、ビスEEH、例えば、式(X)で表される化合物、および/または式(XI)、(XII)、および/または(XIII)で表される化合物に加えて)を含んでいてもよい。いずれの残存するホモファルネソールも、アンブラオキシド産物がビスホモファルネソールを含まないように、他の反応産物から分離されてもよい。他の態様において、ビスホモファルネソール出発材料のすべてが、本明細書に記載のプロセスによって式(X)で表されるアンブラオキシドまたは反応の副産物へ変換される。

10

【0571】

したがって、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、式(XIII)で表される化合物、ビスホモファルネソール出発材料(例として、ビスEEH)、および式(X)で表される化合物の他の立体異性体のうち1以上を含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物と、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物うち1以上とを含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物と、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物のうち1以上とを含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。

20

【0572】

例えば、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物と式(XII)で表される化合物とを含んでいてもよいが、本質的にこれらかなっていてもよいが、またはこれらからなる。

【0573】

例12は、本明細書に記載のSHC/HACバリエーションが次を呈することを実証する：

- E,E-ビス-ホモファルネソール(図10を見よ)に対する、ビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- ビス-ホモファルネソールのE,E異性体に対する、ビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 参照SHC酵素(例として、野生型SHC、たとえば配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、

30

40

50

269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるもの、または215G2 AacS HC、またはSHC#65、またはバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば配列番号2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383によって表されるもの)と比較して、反応の最初の3～6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、ビスEEHの変換の増大された程度、ならびにビスEEHの増大した変換率。

【0574】

全体的に、基質特異性および産物選択性に関する所見は、本明細書に以前ホモファルネソールに関して記載されたものと合致していた。P2突然変異の効果は、E,E-ホモファルネソール以外の基質(E,E-ビス-ホモファルネソールはその一例)へも伝わり得ると結論付けられた。

【0575】

したがって、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%と等しいかまたは約50wt%より多くの式(X)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量に基づき、約55wt%と等しいかまたは約55wt%より多くの、または約60wt%と等しいかまたは約60wt%より多くの、または約65wt%と等しいかまたは約65wt%より多くの、または約70wt%と等しいかまたは約70wt%より多くの、または約75wt%と等しいかまたは約75wt%より多くの、または約80wt%と等しいかまたは約80wt%より多くの、または約85wt%と等しいかまたは約85wt%より多くの、または約90wt%と等しいかまたは約90wt%より多くの、または約95wt%と等しいかまたは約95wt%より多くの式(X)で表される化合物を含んでいてもよい。本明細書に記載の組成物は、例えば、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量に基づき、約100wt%と等しいかもしくは約100wt%未満の式(X)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、混合物は、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量に基づき、約99wt%と等しいかもしくは約99wt%未満の、または約98wt%と等しいかもしくは約98wt%未満の、または約97wt%と等しいかもしくは約97wt%未満の式(X)で表される化合物を含んでいてもよい。例えば、本明細書に記載の組成物は、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量に基づき、約50wt%から約100wt%まで、または約60wt%から約99wt%まで、または約70wt%から約98wt%まで、または約80wt%から約97wt%まで、または約90wt%から約97wt%までの式(X)で表される化合物を含んでいてもよい。

【0576】

本明細書に記載の組成物中の、式(X)で表される化合物:式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量の重量比率は、例えば、約60:40から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(X)で表される化合物:式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約99:1まで、または約70:30から約99:1まで、または約75:25から約99:1まで、または約80:20から約99:1まで、または約85:15から約99:1まで、または約90:10から約99:1まで、または約95:5から約99:1まで及ぶこともある。例えば、式(X)で表される化合物:式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の総重量の重量比率は、約65:35から約98:2まで、または約70:30から約97:3まで、または約75:25から約96:4まで、または約80:20

から約95:5まで、または約85:15から約90:10まで及ぶこともある。

【0577】

本明細書に記載の組成物中の、式(X)で表される化合物:ビスホモファルネソール(例として、ビスEEH)の重量比率は、例えば、約90:10から約100:0まで及ぶこともある。例えば、本明細書に記載の組成物中の式(X)で表される化合物:ビスホモファルネソール(例として、ビスEEH)の重量比率は、約92:8から約100:0まで、または約94:6から約100:0まで、または約95:5から約100:0まで、または約96:4から約99.5:0.5まで、または約97:3から約99.0:1.0まで、または約98:2から約99.0:1.0まで及ぶこともある。

【0578】

立体異性体の混合物中の、式(X)で表される化合物、式(XI)で表される化合物、式(XII)で表される化合物、および式(XIII)で表される化合物の量は、例えば、ガスクロマトグラフィーによって定量化されてもよく、および/または分光法によって同定されてもよい。

10

【0579】

本明細書に記載のプロセスによって(例として、SHC/HAC酵素またはそのバリエーション、および任意に、組換え宿主細胞を使用して)合成されるとおりのアンブラオキシドは、例えば、固体相中に存在していてもよい。それは、アモルファス形態または結晶形態にあってもよい。

【0580】

本明細書に記載の方法によって(例として、SHC/HAC酵素またはそのバリエーション、および任意に、組換え宿主細胞を使用して)産生されるアンブラオキシドは、非水混和性溶媒を使用する蒸気抽出/蒸留または有機溶媒抽出(水性相中に留まっている生体触媒から反応産物および未反応基質を分離するため)、これに続く溶媒の蒸発を受け、ガスクロマトグラフ(GC)分析によって決定されるとおり粗反応産物を得ることによって単離されてもよい。蒸気抽出/蒸留および有機溶媒抽出の方法は、当業者に知られている。

20

【0581】

一例として、その結果得られるアンブラオキシドは、非水混和性溶媒(例えば、トルエン)などの有機溶媒を使用し、全反応混合物から抽出されてもよい。代替的に、その結果得られるアンブラオキシドは、水混和性溶媒(例えば、エタノール)または非水混和性溶媒(例えば、トルエン)を使用し、固体相の反応混合物(例えば、遠心分離または濾過によって得られた)から抽出されてもよい。さらなる一例として、アンブラオキシドは固体として形成される。それは、結晶としてまたはアモルファス形態で固相中に存在していてもよく、また濾過も用いて、残存する固体相(細胞材料またはそのデブリ)および液体相から分離され得る。

30

【0582】

さらなる一例として、アンブラオキシドの融点を上回る温度にて、アンブラオキシドは水性相の上に油層を形成することもあるが、この油層は除去されて収集され得る。油層が除去された後のアンブラオキシドの完全回収を確かにするために、有機溶媒は、バイオマス中またはバイオマス上またはバイオマス周囲に含有されるいずれの残りのアンブラオキシドを抽出するため、バイオマスを含む水性相へ加えられてもよい。有機層は、その全体がさらに処理されてアンブラオキシドを単離し精製する前に、油層と組み合わせられ得る。アンブラオキシドは、さらに選択的に結晶化されることで、副産物(XI)、(XII)、および(XIII)と、いずれの未反応ビスホモファルネソール基質とが最終アンブラオキシド産物から除去されてもよい。用語「選択的結晶化」は、化合物(XI)、(XII)、および(XIII)は結晶化溶媒中に溶解したままであるのに、アンブラオキシドが溶媒から、単離結晶材料がアンブラオキシド産物のみを含有する(またはそれが、他の化合物(X)、(XII)、または(XIII)のいずれかを含有するなら、その場合これらは嗅覚的に許容し得る量でしか存在しない)程度まで結晶化させられるところの処理ステップを指す。アンブラオキシドは、例えば、副産物(XI)、(XII)、および(XIII)がなくてもよく、または実質的にこれらがなくてもよい。選択的結晶化ステップは、エタノールなどの水混和性溶媒または同種の

40

50

ものを使用してもよい。アンブラオキシドの選択的結晶化は、未反応ホモファルネソール基質の存在による影響が、またアンブラオキシド:他の検出可能な副産物(XI)、(XII)、および/または(XIII)の比率による影響も、及ぼされることがある。ホモファルネソール基質のアンブラオキシドへの変換が10%しか得られなかったとしても、アンブラオキシドの選択的結晶化は依然として実行可能である。

【0583】

最終アンブラオキシド産物の嗅覚的純度は、水中10%エタノール抽出物を使用して、または結晶材料を試験することによって、決定されてもよい。最終アンブラオキシド産物は、その嗅覚的純度、品質、およびその官能プロファイルについて、市販のアンブラオキシド産物参照に対し試験される。アンブラオキシド材料はまた、材料がその感覚刺激性プロファイルに関する仕様を満たすか決定するために、専門家による応用研究においても試験される。

【0584】

アンブラオキシドの抽出および/または選択的結晶化における使用に好適な、好適な水混和性および非水混和性の有機溶媒の例は、これらに限定されないが、脂肪族炭化水素、好ましくは5~8個の炭素原子を有するもの、たとえば、ペンタン、シクロペンタン、ヘキサン、シクロヘキサン、ヘプタン、オクタン、またはシクロオクタン、ハロゲン化脂肪族炭化水素、好ましくは1個もしくは2個の炭素原子を有するもの、たとえば、ジクロロメタン、クロロホルム、四塩化炭素、ジクロロエタン、またはテトラクロロエタン、芳香族炭化水素、たとえば、ベンゼン、トルエン、キシレン、クロロベンゼン、またはジクロロベンゼン、脂肪族の非環式および環状のエーテルあるいはアルコール、好ましくは4~8個の炭素原子を有するもの、たとえば、エタノール、イソプロパノール、ジエチルエーテル、メチルtert-ブチルエーテル、エチルtert-ブチルエーテル、ジプロピルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジブチルエーテル、テトラヒドロフラン、またはエステル、たとえば、酢酸エチルもしくは酢酸n-ブチル、またはケトン、たとえば、メチルイソブチルケトン、またはジオキサン、またはこれらの混合物を包含する。とくに好ましく使用される溶媒は、上述したヘプタン、メチルtert-ブチルエーテル(また、MTBE、tert-ブチルメチルエーテル、三級ブチルメチルエーテル、およびtBMEとしても知られている)、ジイソプロピルエーテル、テトラヒドロフラン、酢酸エチル、および/またはそれらの混合物である。好ましくは、エタノールなどの水混和性溶媒は、固体相の反応混合物からのアンブラオキシドの抽出のために使用される。エタノールは扱いが容易であり、非毒性かつ低環境負荷型であるので、エタノールの使用が有利である。

【0585】

用語「単離された」は、本明細書に使用されるとき、アンブラオキシドなどの生物変換産物を伴う構成要素から分離または精製された前記生物変換産物を指す。ある実体が天然の起源とする供給源とは異なる細胞系において産生されるその実体は「単離された」ものである。なぜなら、前記細胞系には、その実体を天然に伴う構成要素が必ずしもないからであろう。単離または純度の度合いは、いずれの適切な方法、例として、ガスクロマトグラフィー(GC)分析、HPLC分析、またはNMR分析によっても測定され得る。

【0586】

いくつかの態様において、最終産物(アンブラオキシド)は、均一(例として、少なくとも80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、もしくは89.5%純粋、または90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、もしくは99.5%純粋)になるまで単離され精製される。

【0587】

望ましくは、産生されるアンブラオキシドの量は、約20g/lから約200g/lまで、または100~200g/l、好ましくは約125g/lまたは150g/lまたは約188g/lなど、約1mg/lから約20,000mg/l(20g/l)まで、またはこれより多くてもよい。

【0588】

例えば、約1~約100mg/l、約30~約100mg/l、約50~約200mg/l、約100~約

10

20

30

40

50

500mg/l、約100～約1,000mg/l、約250～約5,000mg/l、約1,000(1g/l)～約15,000mg/l(15g/l)、または約2,000(2g/l)～約10,000mg/l(10g/l)、または約2,000(2g/l)～約25,000mg/l(25g/l)、または約2,000(2g/l)～約25,000mg/l(25g/l)、26,000mg/l(26g/l)、27,000mg/l(27g/l)、28,000mg/l(28g/l)、29,000mg/l(29g/l)、30,000mg/l(30g/l)、40g/l、50g/l、60g/l、70g/l、80g/l、90g/l、100g/l、110g/l、120g/l、125g/l、130g/l、140g/l、150g/l、160g/l、170g/l、180g/l、190g/l、または200g/l、または300g/l、または400g/l、または500g/lのアンブラオキシドが産生される。

好ましくは、少なくとも100g/lの濃度でのアンブラオキシドは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

10

【0589】

好ましくは、約150g/lの濃度でのアンブラオキシドは、48時間から72時間までの期間内に産生される。好ましくは、約200g/lの濃度でのアンブラオキシドは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

好ましくは、約250g/lの濃度でのアンブラオキシドは、48時間から72時間までの期間内に産生される。

【0590】

本開示に従うビスホモファルネソールのアンブラオキシドへの生物変換は、(-)-アンブロックスを主たる化合物として産生するが、アンブラオキシド以外の化合物もまた産生することもあり、これらは心地良い嗅覚ノートを生生物変換混合物へ付与してもまたは付与しなくてもよく、そのため積極的または消極的なやり方でアンブラオキシド最終産物の官能特徴へ寄与することもある。結果的に、官能分析は、熟練した専門家(例として、調香師)によって利用され十分に確立された官能試験を使用し、試験が、化学的に関係のある産物が参照産物と比べて嗅覚的に関係のある最終産物でもあるかを決定することに役立ち得るように、実行される。アンブラオキシドからの1以上の副産物化合物の除去は、除去された化合物が実際にそれ自体無臭の化合物であったとしても、残存する化合物(アンブラオキシド)のにおいを改善し得る。つまり、アンブラオキシドのにおい増強は、化合物XI、XII、およびXIIIの不在下で観察されることもある。

20

【0591】

アンブラオキシドの様々な用途は、目下利用可能なアンブラオキシド成分が商業的に使用されるところの本質的にすべての産物を包含する、布の仕上げ剤、洗面用具、美容用品および洗浄製品、洗剤製品、ならびに石鹸製品などの、高級フレグランスまたは消費者向製品を包含するがこれらに限定されない。

30

【0592】

よって、本明細書に記載のプロセスによって得られたかもしくはそれによって得ることができるアンブラオキシドの、フレグランスまたは化粧料または消費者向製品の一部としての使用が本明細書にさらに提供される。本明細書に記載のプロセスによって得られたかまたはそれによって得ることができるアンブラオキシドを含む製品もまた、本明細書に提供される。製品は、例えば、フレグランスまたは化粧料または消費者向製品であってもよい。

40

【0593】

フレグランス組成物

フレグランス組成物としての、またはフレグランス組成物における、本明細書に記載の化合物および組成物の使用が本明細書にさらに提供される。

【0594】

よって、式(I)または(X)で表される1以上の化合物を含むフレグランス組成物もまた本明細書に提供される。「フレグランス組成物」は、例えば、式(I)または(X)で表される1以上の化合物および基材を含むいずれの組成物であってもよい。

【0595】

本明細書に使用されるとき、「基材」は、精油、アルコール、アルデヒドおよびケトン

50

、エーテルおよびアセタール、エステルおよびラクトン、大員環およびヘテロ環などの、および/または、フレグランス組成物中において物質と併せて、従来使用されている1以上の成分もしくは賦形剤(例えば、当該技術分野において一般的に使用される担体材料、希釈剤、および他の助剤)と混和されて、目下利用可能である、広範な範囲の天然産物と合成分子とから選択される、知られているすべてのフレグランス成分を包含する。

【0596】

当該技術分野に知られているフレグランス成分は、主要なフレグランス製造業者から商業上、容易に利用可能である。かかる成分の非限定例は次を包含する:

- 精油ならびに抽出物、例として、海狸香、コスタスルート(costus root)油、オークモスアブソリュート、ゼラニウム油、ツリーモス(tree moss)アブソリュート、バジル油、果実油、たとえば、ベルガモット油およびマンダリン油、ミルテ油、パルマローザ油、パッチュリ油、プチグレン油、ジャスミン油、バラ油、白檀油、アブサン油、ラベンダー油、および/またはイランイラン油;

【0597】

- アルコール、例として、桂皮アルコール((E)-3-フェニルプロパ-2-エン-1-オール);cis-3-ヘキセノール((Z)-ヘキサ-3-エン-1-オール);シトロネロール(3,7-ジメチルオクタ-6-エン-1-オール);ジヒドロミルセノール(2,6-ジメチルオクタ-7-エン-2-オール);エバノール(Ebanol)(商標)((E)-3-メチル-5-(2,2,3-トリメチルシクロペンタ-3-エン-1-イル)ペンタ-4-エン-2-オール);オイゲノール(4-アリル-2-メトキシフェノール);エチルリナロール((E)-3,7-ジメチルノナ-1,6-ジエン-3-オール);ファルネソール((2E,6Z)-3,7,11-トリメチルドデカ-2,6,10-トリエン-1-オール);ゲラニオール((E)-3,7-ジメチルオクタ-2,6-ジエン-1-オール);スーパーミュゲ(Super Muguet)(商標)((E)-6-エチル-3-メチルオクタ-6-エン-1-オール);リナロール(3,7-ジメチルオクタ-1,6-ジエン-3-オール);メントール(2-イソプロピル-5-メチルシクロヘキサノール);ネロール(3,7-ジメチル-2,6-オクタジエン-1-オール);フェニルエチルアルコール(2-フェニルエタノール);ロジノール(Rhodinol)(商標)(3,7-ジメチルオクタ-6-エン-1-オール);サンダロア(Sandalore)(商標)(3-メチル-5-(2,2,3-トリメチルシクロペンタ-3-エン-1-イル)ペンタン-2-オール);テルピネオール(2-(4-メチルシクロヘキサ-3-エン-1-イル)プロパン-2-オール);またはティンベロール(Timberol)(商標)(1-(2,2,6-トリメチルシクロヘキシル)ヘキサン-3-オール);2,4,7-トリメチルオクタ-2,6-ジエン-1-オール、および/または[1-メチル-2(5-メチルヘキサ-4-エン-2-イル)シクロプロピル]-メタノール;

【0598】

- アルデヒドならびにケトン、例として、アニスアルデヒド(4-メトキシベンズアルデヒド);アルファアミル桂皮アルデヒド(2-ベンジリデンヘプタナール);ゲオルギーウッド(Georgywood)(商標)(1-(1,2,8,8-テトラメチル-1,2,3,4,5,6,7,8-オクタヒドロナフタレン-2-イル)エタノン);ヒドロキシシトロネラール(7-ヒドロキシ-3,7-ジメチルオクタナール);イソEスーパー(Iso E Super)(登録商標)(1-(2,3,8,8-テトラメチル-1,2,3,4,5,6,7,8-オクタヒドロナフタレン-2-イル)エタノン);イソラルデイン(Isoraldeine)(登録商標)((E)-3-メチル-4-(2,6,6-トリメチルシクロヘキサ-2-エン-1-イル)ブタ-3-エン-2-オン);3-(4-イソブチル-2-メチルフェニル)プロパナール;マルトール;メチルセドリルケトン;メチルイオノン;ベルベノン;および/またはバニリン;

【0599】

- エーテルならびにアセタール、例として、アンブロックス(登録商標)(3a,6,6,9a-テトラメチル-2,4,5,5a,7,8,9,9b-オクタヒドロ-1H-ベンゾ[e][1]ベンゾフラン);ゲラニルメチルエーテル((2E)-1-メトキシ-3,7-ジメチルオクタ-2,6-ジエン);ローズオキシド(4-メチル-2-(2-メチルプロパ-1-エン-1-イル)テトラヒドロ-2H-ピラン);および/またはスピランブレネ(Spirambrene)(登録商標)(2',2',3,7,7-ペンタメチルスピロ[ビスシクロ[4.1.0]ヘプタン-2,5'-[1,3]ジオキサン]);

【0600】

- 大員環、例として、アンブレットリド((Z)-オキサシクロヘプタデカ-10-エン-2-オン)

;ブラシル酸エチレン(1,4-ジオキサシクロヘプタデカン-5,17-ジオン);および/またはエグザルトリド(Exaltolide)(登録商標)(16-オキサシクロヘキサデカン-1-オン);ならびにヘテロ環、例として、イソブチルキノリン(2-イソブチルキノリン)

【0601】

本明細書に使用されるとき、「担体材料」は、におい物質の観点から実際的にニュートラルの材料、すなわち、におい物質の官能特性を有意には改変しない材料を意味する。

【0602】

「希釈剤」とは、フタル酸ジエチル(DEP)、ジプロピレングリコール(DPG)、ミリスチン酸イソプロピル(IPM)、クエン酸トリエチル(TEC)、およびアルコール(例として、エタノール)などの、におい物質と併せて従来使用されているいずれの希釈剤も意図する。

10

【0603】

用語「助剤」は、フレグランス組成物の嗅覚性能に特に関連しない理由から、該組成物に採用されてもよい成分を指す。例えば、抗酸化アジュバントなどの、助剤は、フレグランス成分(単数もしくは複数)または該成分(単数もしくは複数)を含有する組成物を処理する補助剤として作用する成分であってもよく、あるいはフレグランス成分もしくは同成分を含有する組成物の操作または保管を改善させてもよい。該抗酸化剤は、例えば、チノガード(Tinogard)(登録商標)TT(BASF)、チノガード(登録商標)Q(BASF)、トコフェロール(Tocopherol)(その異性体、CAS 59-02-9;364-49-8;18920-62-2;121854-78-2を包含する)、2,6-ビス(1,1-ジメチルエチル)-4-メチルフェノール(BHT、CAS 128-37-0)、および関連するフェノール、ヒドロキノン(CAS 121-31-9)から選択されてもよい。

20

【0604】

それはまた、色または質感を付与するなどの追加の恩恵を提供する成分であってもよい。それはまた、耐光性または化学安定性を、フレグランス組成物中に含有される1以上の成分へ付与する成分であってもよい。

【0605】

助剤を含有するフレグランス組成物において一般的に使用される同助剤の性質およびタイプの詳細を徹底的に記載することはできないが、該成分が当業者に周知であることは言及しておかなければならない。

30

【0606】

本明細書に記載のとおり化合物もしくは組成物、またはフレグランス組成物(そのいずれの態様も包含する)を含む消費者向製品もまた本明細書に提供される。消費者向製品は、例えば、化粧品(例として、オードパルファムもしくはオードトワレ)、洗浄製品、洗剤製品、または石鹸製品であってもよい。

【0607】

以下の付番の段落は、本開示のさらなる側面を定義する。

段落1:次を含むスクアレン-ホペン-シクラーゼ(SHC)の酵素活性をもつタンパク質

a)配列番号1のAlicyclobacillus acidocaldariusの野生型SHC(野生型AacSHC)に対して突然変異したアミノ酸配列、ここで配列番号1の位置169でのWは、G、A、およびVからなる群から選択される1つのアミノ酸、もしくは突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物によって置き換えられ、ここで突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物は、突然変異したアミノ酸配列のアミノ酸配列と38,0%から99,9%までのアミノ酸配列同一性を有し、または

40

b)野生型SHC(WT-SHC)に対して突然変異したアミノ酸配列、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、G、A、およびVからなる群から選択されるアミノ酸、もしくは突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物によって置き換えられ、ここで突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物は、突然変異したアミノ酸配列のアミノ酸配列と38,0%から99,9%までのアミノ酸配列同一性を有する。

50

【0608】

段落2:配列番号1の野生型AacSHCに対して突然変異したアミノ酸配列は、配列番号315、316、または317のアミノ酸配列である、段落1のタンパク質。

【0609】

段落3:WT-SHCは、*Acetobacter pasteurianus*(ApaSHC1、配列番号24)、*Burkholderia ambifaria*(BamSHC1、配列番号28、BamSHC2、配列番号29)、*Bradyrhizobium japonicum*(BjaSHCもしくはBjpSHC、配列番号119)、*Pelobacter carbinolicus*または*Syntrophotalea carbinolica* DSM2380(PcaSHC2、配列番号30)、*Rhodopseudomonas palustris*(RpaSHC1、配列番号31)、*Streptomyces coelicolor*(ScoSHC、配列番号32)、*Syntrophobacter fumaroxidans*(SfuSHC1、配列番号33)、*Teredinibacter turnerae*(TtuSHC、配列番号34)、*Zymomonas mobilis*(ZmoSHC1、配列番号13もしくは14、ZmoSHC2、配列番号15)、および*Thermosynechococcus elongatus*(TelSHC、配列番号23)のWT-SHCからなる群から選択される、段落1のタンパク質。

10

【0610】

段落4:配列番号13、14、15、23~24、28、29、30、31、32、33、34のWT-SHCに対して突然変異したアミノ酸配列は、配列番号302、303、304のアミノ酸配列である、段落1または3のタンパク質。

【0611】

段落5:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置169でのWは、Gによって置き換えられるか(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応する野生型TelSHC(配列番号23)のアミノ酸配列の位置172でのWは、Gによって置き換えられる(配列番号302、304)。

20

【0612】

段落6:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置600でのGは、A、V、L、I、およびMからなる群から選択される1つのアミノ酸によって置き換えられるか(配列番号318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、305)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのG600に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけGは、A、V、L、I、およびMからなる群から選択されるアミノ酸によって置き換えられる。

30

【0613】

段落7:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置306でのAは、Vによって置き換えられるか(配列番号333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、352)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのA306に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけPもしくはCは、Vによって置き換えられる。

40

【0614】

段落8:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置169でのWは、Gによって置き換えられるか(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、もしくはCは、Sによって置き換えられる。

【0615】

段落9:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、

50

ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

【0616】

段落10:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、またはCは、Sによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

10

【0617】

段落11:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置169でのWは、Aによって置き換えられるか(配列番号316、323、324、325、326、327、338、339、340、341、342、351)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Aによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、もしくはCは、Sによって置き換えられる。

【0618】

20

段落12:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Aによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

【0619】

段落13:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Aによって置き換えられ、配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、またはCは、Sによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

30

【0620】

段落14:先行する請求項のいずれか1つのタンパク質をコードする核酸配列、とりわけ配列番号349において同定される核酸配列。

【0621】

段落15:段落14の核酸配列を含む、発現カセット。

段落16:段落14の核酸配列または請求項15の発現カセットを含む、ベクター。

【0622】

段落17:段落16のベクター、または段落15の発現カセット、または段落14の核酸配列を含む、宿主細胞。

40

【0623】

段落18:SHCの酵素活性をもつ生体触媒を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

a)段落1~13のいずれか1つに従うタンパク質をコードする核酸配列を含む、段落17の宿主細胞を提供すること、

b)ステップa)の宿主細胞を、タンパク質の発現を可能にする条件下で培養培地中で培養すること、および

c)生体触媒、とりわけ発現されたタンパク質、または発現されたタンパク質を含む宿主細胞を得ること。

50

【0624】

段落19.生体触媒、とりわけ段落18のプロセスに従って調製される生体触媒であって、ここで生体触媒は、段落1～13のいずれか1つに従うタンパク質、段落1～13のいずれか1つに従うタンパク質を含む宿主細胞、段落1～13のいずれか1つに従うタンパク質を含む、宿主細胞ライセート、凍結乾燥された宿主細胞、宿主細胞抽出物、または宿主細胞画分である。

【0625】

段落20.(-)-アンブロックスを含む組成物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む：

- x) ホモファルネソール、反応媒体、および段落19の生体触媒を提供すること、
- y) 提供されたホモファルネソールを反応媒体および段落19の生体触媒と混合し、およびホモファルネソールを、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) (-)-アンブロックスを含む組成物を得ること。

【0626】

段落21.ヒトまたは動物への使用のための芳香剤(aroma)を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む：

- i) 段落20に従うプロセスを実施すること、
- j) ステップi)で得られた(-)-アンブロックスおよび少なくとも1つのさらなる構成要素を含む組成物を混和すること、
- l) 組成物および少なくとも1つのさらなる構成要素を含む、ヒトまたは動物への使用のための芳香剤を得ること。

【0627】

段落22.最大で2つまでもしくは2つ以上のSHC活性部位突然変異、および/またはSHC活性部位変異以外に最大で2つまでもしくは2つ以上の部位突然変異、を含む生体触媒であって、ここで活性部位突然変異は、表10に列挙される活性部位アミノ酸位置(AacSHCに基づく)から選択され、活性部位の位置36、168、169、261、306、307、312、365、366、420、489、600、607、609、および/または612、好ましくは169、261、312、365、489、600、609、および/または612を含み、かつここで活性部位突然変異以外の突然変異は、本明細書に開示の表7および/または表8および/または表9および/または表18に列挙される部位突然変異から選択され、好ましくはM132Rおよび/またはI432Tあるいはその機能的同等物を含み、ここで生体触媒は、タンパク質、タンパク質を含む宿主細胞、タンパク質を含む宿主細胞ライセート、凍結乾燥された宿主細胞、宿主細胞抽出物、または宿主細胞画分である。一例として、WO2016/170099の図19は、SHC結晶構造上、SHC/HACバリエーション101A10、111C8、および215G2(M132R、I432T、およびA224Vを含む)において同定された非活性部位突然変異の場所を示す。AacSHC結晶構造のCAVER分析は、本明細書に記載されるような有益な活性部位突然変異および活性部位突然変異以外の部位突然変異を含むSHCバリエーションを使用して、着目した産物の調製に有用な活性部位突然変異以外の、有用な活性部位突然変異および部位突然変異を同定するために実施され得る。

【0628】

段落23.(-)-アンブロックスを含む組成物または(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む：

- x) ホモファルネソール、反応媒体、および段落22の生体触媒を提供すること、
- y) 提供されたホモファルネソールを反応媒体および段落22の生体触媒と混合し、およびホモファルネソールを、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) (-)-アンブロックスを含む組成物を得ること。

【0629】

段落24.(-)-アンブロックスを含む組成物または(-)-アンブロックスを含む混合物を調

製するためのプロセスであって、以下のステップを含む：

- x) ホモファルネソール、反応媒体、および表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒を提供すること
- y) 提供されたホモファルネソールを、反応媒体と、表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒とともに混合し、およびホモファルネソールを、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) (-)-アンブロックスを含む組成物を得ること。

【0630】

段落25. アンベルケタールを含む組成物またはアンベルケタールを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む：

- x) ヒドロキシファルネシルアセトン、反応媒体、および表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒を提供すること
- y) 提供されたヒドロキシファルネシルアセトンを、反応媒体と、表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒とともに混合し、およびヒドロキシファルネシルアセトンを、ヒドロキシファルネシルアセトンをアンベルケタールへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) アンベルケタールを含む組成物を得ること。

【0631】

段落26. アンブラオキシドを含む組成物またはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む：

- x) (2-E)-ビスホモファルネソール(ビスEEH)、反応媒体、および表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒を提供すること
- y) 提供されたビスEEHを、反応媒体と、表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒とともに混合し、およびビスEEHを、ビスEEHをアンブラオキシドへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) アンブラオキシドを含む組成物を得ること。

【0632】

段落27: (-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、ここで(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含む立体異性体の混合物は、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換されるが、ここで酵素的変換は、(-)-アンブロックスの産生に好適な反応条件下でSHC/HAC酵素を使用して実行され、ならびにここでEEHを含む立体異性体の混合物は、以下の[(3E,7E)および[(3Z,7E)]および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]および/または[(3Z,7E)、(3E,7E)、および(3E,7Z)](また夫々[EE:EZ]、[EE:ZE]、および[EE:EZ:ZE]とも指定される)からなる群の1以上から選択されるホモファルネソール異性体から本質的になり、ならびにここでSHC/HAC酵素ポリペプチド配列は、表2、表3、表7、表8、表9、表16、または表18から選択されるSHC酵素またはSHC酵素バリエーション、および/または表2、表3、表7、表8、表9、表16、もしくは表18から選択されたとおりのSHCアミノ酸配列またはSHCバリエーションアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも40%の同一性、少なくとも50%の同一性、または少なくとも60%の同一性、または少なくとも70%の同一性、または少なくとも80%の同一性、または少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性、または少なくとも96%の同一性、または少なくとも97%の同一性、または少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性をもつ配列からなる群から選択される。

【0633】

本出願の上に言及される側面の文脈内で、配列番号1は、*Alicyclobacillus acidocaldarius*からの野生型SHC(野生型AacSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号24は、*Acetobacter pasteurianus*のWT-SHC(ApaSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号28は、*Burkholderia ambifaria*のWT-SHC(BamSHC1)のアミノ酸配列を表す。配列番

10

20

30

40

50

号29は、*Burkholderia ambifaria*のWT-SHC(BamSHC2)のアミノ酸配列を表す。配列番号16は、*Bradyrhizobium japonicum*のWT-SHC(BjaSHCまたはBjpSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号30は、*Pelobacter carbinolicus*(PcaSHC)または*Syntrophotalea carbinolica* DSM2380のWT-SHCのアミノ酸配列を表す。配列番号31は、*Rhodopseudomonas palustris*のWT-SHC(RpaSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号32は、*Streptomyces coelicolor*のWT-SHC(ScsSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号33は、*Syntrophobacter fumaroxidans*のWT-SHC(SfuSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号34は、*Teredinibacter turnerae*のWT-SHC(TtuSHC)のアミノ酸配列を表す。配列番号13は、*Zymomonas mobilis*のWT-SHC(ZmoSHC1)のアミノ酸配列を表す。配列番号15は、*Zymomonas mobilis*のWT-SHC(ZmoSHC2)のアミノ酸配列を表す。配列番号23は、*Thermosynechococcus elongatus*のWT-SHC(TelSHC、配列番号13)のアミノ酸配列を表す。配列番号315は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されている(W169G)。配列番号316は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されている(W169A)。配列番号317は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はVによって交換されている(W169V)。配列番号318は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されており(W169G)、およびG600はAによって交換されている(G600A)。配列番号319は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されており(W169G)、およびG600はVによって交換されている(G600V)。配列番号320は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されており(W169G)、およびG600はLによって交換されている(G600L)。配列番号321は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されており(W169G)、およびG600はIによって交換されている(G600I)。配列番号322は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されており(W169G)、およびG600はMによって交換されている(G600M)。配列番号323は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されており(W169A)、およびG600はAによって交換されている(G600A)。配列番号324は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されており(W169A)、およびG600はVによって交換されている(G600V)。配列番号325は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されており(W169A)、およびG600はLによって交換されている(G600L)。配列番号326は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されており(W169A)、およびG600はIによって交換されている(G600I)。配列番号327は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されており(W169A)、およびG600はMによって交換されている(G600M)。配列番号328は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はVによって交換されており(W169V)、およびG600はAによって交換されている(G600A)。配列番号329は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はVによって交換されており(W169V)、およびG600はVによって交換されている(G600V)。配列番号330は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ

10

20

30

40

50

50

0はIによって交換されており(G600I)、およびA306はVによって交換されている(A306V)。配列番号347は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はVによって交換されており(W169V)、G600はMによって交換されており(G600M)、およびA306はVによって交換されている(A306V)。配列番号348は、野生型AacSHC(配列番号1)からの基準SHCの突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでM132はRによって交換され(M132R)に、A224はVによって交換され(A224V)に、およびI432はTによって交換されている(I432T)。配列番号349は、*Alicyclobacillus acidocaldarius*からの野生型SHC(野生型AacSHC、配列番号1)のヌクレオチド配列を表す。配列番号350は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換されており(W169G)、およびA306はVによって交換されている(A306V)。配列番号351は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はAによって交換されており(W169A)、およびA306はVによって交換されている(A306V)。配列番号352は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はVによって交換されており(W169V)、およびA306はVによって交換されている(A306V)。配列番号302は、野生型TelSHC(配列番号23)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW172はGによって交換され(W172G)、P311はAによって交換され(P311A)、F425はYによって交換され(F425Y)、およびG609はAによって交換されている(G609A)。配列番号303は、野生型ZmoSHC1(配列番号13)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでQ221はSによって交換され(Q221S)、W222はGによって交換され(W222G)、A368はVによって交換され(A368V)、F486はYによって交換され(F486Y)、およびG667はAによって交換されている(G667A)。配列番号304は、野生型TelSHC(配列番号23)からの突然変異体SHCの突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW172はGによって交換されている(W172G)。配列番号305は、野生型AacSHC(配列番号1)からの突然変異体SHCの機能的同等物の突然変異したアミノ酸配列を表すが、ここでW169はGによって交換され(W169G)、G600はMによって交換され(G600M)、M132はRによって交換され(M132R)、A224はVによって交換され(A224V)、およびI432はTによって交換されている(I432T)。

10

20

30

【0634】

WO2016/170099の図19およびEichhorn et al Adv.Synth.Catal(2018)360:2339-2351の図1は、SHC/HACバリエーション101A10、111C8、および215G2(M132R、I432T、およびA224Vを含む)において同定された活性部位突然変異以外の部位突然変異の、SHC結晶構造(色付き)上の場所を示す:バリエーション215G2は赤色;バリエーション101A10は紫色(ワインレッド色)、およびバリエーション111C8は緑色である。増大した活性の原因として同定されたアミノ酸につき、その側鎖は、共結晶化された基質類似体において黄色で強調される。活性が何ら改善されてないと同定されたバリエーションの他の突然変異は、青色でマークされる。青色の突然変異は、酵素の2つのドメインにわたり約半分ずつ(すなわち、50:50)広がっている一方、同定された有益なAacSHC突然変異はほとんど(1つを除いて)、ドメイン2に位置付けられることに留意する。唯一の例外は、活性部位の近くにある突然変異F601Yである。図20 WO2016/170099およびEichhorn et al Adv.Synth.Catal(2018)360:2339-2351の図1は、以下の突然変異を(黒色および白色で)示す:SHC/HAC活性に有益な効果を一切有さない突然変異は黒色で示され、それらはSHC酵素の2つのドメインにわたって広がっている。灰色で示されるのは、SHCバリエーション(101A10、111C8、および215G2)において同定された突然変異であって、それらは改善されたSHC/HAC活性を示し、唯一の例外はあるが、SHC酵素のドメイン2に位置付けられる。バリエーションの改善された活性へ寄与する突然変異の側鎖が強調される;

40

【0635】

本明細書に開示されるこの改善は、具体的な突然変異がWTまたはSHCバリエーションに導

50

入されたとき、総代謝回転数(1つの酵素分子が触媒し得る反応の総数)の増大に起因し得る。この増大した総代謝回転数は、その結果得られるSHC酵素バリエーションの、増大した触媒作用の潜在力もしくは増大した安定性、またはその2つの組み合わせの結果でもあり得る。増大した安定性は、SHCバリエーションのための、例えば温度およびSDS濃度がより有意に低い最適反応条件の結果でもあり得る。

【0636】

本明細書およびこれに続くクレームを通してずっと、文脈が別様に要さない限り、語「含む(comprise)」、ならびに「含む(comprises)」および「含む(comprising)」などのバリエーションは、定められた整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群を包含するが、排除のいずれの他の整数もしくはステップ、または整数もしくはステップの群を排除しないことを暗示することが理解されるであろう。用語「含む(comprising)」はまた「包含する(including)」ならびに「からなる(consisting)」も意味し、例として、Xを「含む(comprising)」組成物は、専らXからなっているてもよく、または追加の何か、例としてX+Yを包含しているてもよい。本明細書および添付のクレームに使用されるとき、単数形の「a」、「an」、および「the」は、別様に内容が明確に指図しない限り、複数形の指示対象を包含することにもまた、留意しなければならない。一例として、「遺伝子(a gene)」または「酵素(an enzyme)」への言及は、「1以上の遺伝子」または「1以上の酵素」への言及である。

【0637】

本文書およびそのクレームにおいて、動詞「を含む」およびその活用は、その非限定的な意味において、その語に続く事柄が包含されることを意味するために使用されるが、特に言及されない事柄が除外されることはない。加えて、動詞「からなる」は、本明細書に記載のとおり組成物が、具体的に同定された構成要素以外に追加の構成要素(単数または複数)を含んでいてもよいことを意味する「本質的にからなる」によって置き換えられてもよく、該追加の構成要素(単数または複数)は本発明のユニークな特徴を変更しないものである。加えて、動詞「からなる」は、本明細書に記載のとおり方法または使用が、具体的に同定されたステップ以外に追加のステップ(単数または複数)を含んでいてもよいことを意味する「本質的にからなる」によって置き換えられてもよく、該追加のステップ(単数または複数)は本発明のユニークな特徴を変更しないものである。加えて、動詞「からなる」は、本明細書に記載のとおりヌクレオチド配列またはアミノ酸配列が、追加のヌクレオチドまたはアミノ酸を、具体的に同定されたもの以外に含んでいてもよいことを意味する「本質的にからなる」によって置き換えられてもよく、該追加のヌクレオチドまたはアミノ酸は本発明のユニークな特徴を変更しないものである。

【0638】

本明細書に使用されるとき、「少なくとも」をもつ具体的な値は、具体的な値以上の値を意味する。例えば、「少なくとも2つの」は、「2以上」と同じである、すなわち2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、...等々であると理解されるべきである。

【0639】

語「約」または「およそ」は好ましくは、数値(例として約10)に関連して使用されるとき、その値は、(10という)所定値から1%多い値であってもまたは1%少ない値であってもよいことを意味する。

【0640】

本明細書に使用されるとき、用語「および/または」は、用語「および/または」によって接続される群のすべてのメンバーが、いずれかの組み合わせにおいて互い累積的にも、かつ互いに代替的にも表されることを意味するものと理解される。代表的に表現「A、B、および/またはC」について、以下の開示が、その条件下で理解されるべきである: i) (AまたはBまたはC)、あるいはii) (AおよびB)、あるいはiii) (AおよびC)、あるいはiv) (BおよびC)、あるいはv) (AおよびBおよびC)、あるいはvi) (AおよびBまたはC)、あるいはvii) (AまたはBおよびC)、あるいはviii) (AおよびCまたはB)。

【0641】

本明細書に使用されるとき、用語「実質的にない」は、化合物または組成物に他の構成要素がほとんどないが、意図的には加えられていない他の構成要素が微量に存在するかもしれないところ、100%純粋であることが保証されないことを意味するものと理解される。用語は、他の構成要素の存在を可能にするものであるが、ただしそれらは、クレームされる化合物または組成物の基本的な特徴に一切影響を及ぼさない。

【0642】

様々な態様が本明細書に記載されている。本明細書に同定されたとおりの各態様は、別様に指し示されていない限り、一緒に組み合わせられていてもよい。本明細書に記載の具体的な方法論、プロトコル、および試薬は変動するものであってもよいところ、本開示がこれらに限定されないことは理解されるべきである。また、本明細書に使用される専門用語は、具体的な態様を記載する目的のみであって、添付のクレームによってのみ限定される本開示の範囲を限定する意図はないことも理解されるべきである。別様に定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術的用語および科学用語は、当業者によって一般的に理解される意味と同じ意味を有する。本開示に従い、従来の分子生物学、微生物学、および組換えDNA技法が採用されてもよく、これらは当該技術分野の技能の範囲内にある。

【0643】

本開示は、その適用において、以下の記載によって表されるかまたは図面中に説明される構築物の詳細および構成要素の配置に限定されない。本開示は、他の態様も可能であって、様々な手法で実践または実行されることが可能である。また、本明細書に使用される言い回しおよび専門用語も、記載するのが目的であって、限定として見なされるべきではない。好ましくは、本明細書に使用される用語は、“A multilingual glossary of biotechnological terms:(IUPAC Recommendations)”, Leuenberger, H.G.W, Nagel, B. and Kolbl, H. eds. (1995), Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Switzerland)に記載のとおり定義される。

【0644】

本明細書の本文を通して幾つかの文書を引用する。本明細書中に引用される文書の各々(すべての特許、特許出願、科学刊行物、製造業者の仕様書、指示、GenBank受託番号配列提出等々を包含する)、上述または下述にかかわらず、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0645】

生物変換反応における使用のための材料のストック(125g/l基質またはこれより高い)をg/l(例えば、生体触媒懸濁液)またはw/w%(例えば、SDS)濃度のいずれかの単位で調製した。生物変換反応を、例えば、例4に記載されたとおり、個々の構成要素(例えば、基質、生体触媒懸濁液、SDS溶液、反応緩衝剤のストック)の要求量を重量で加えることによってセットした。この理由から、反応混合物の実際の体積は、体積単位ではなく質量単位で表現されている(例えば、例4を見よ)。使用される基質が油(密度<1)なので、例として、150gの総反応質量(例えば、例4にあるとおり)は150mlの反応体積にはならない。それでもなお、生物変換反応混合物中の個々の構成要素の濃度は、体積当たりの質量(例えば、g/lまたは(w/v)%)で指し示され、よって、例として150gの総反応質量(例えば、例4にあるとおり)が150mlの反応体積(例えば、例4にあるとおり)に厳密に対応しないことを考慮しない。

【0646】

疑念を回避するため、例、図、および図への凡例中のEEHへのすべての言及は、ホモファルネソールのEE異性体への言及である。使用されるEEHは、80:20の重量比率のEE:EZ異性体の混合物を含むホモファルネソールストックから取られる。

【0647】

本明細書に記載の例は、本開示を説明するものであって、それへの限定としては意図しない。本開示の種々の態様は、本開示に従って記載されている。多くの改良およびバリエーションは、本開示の精神および範囲から逸脱せずに、本明細書に記載され説明されてい

10

20

30

40

50

る技法に対してなされてもよい。結果的に、例は説明に過ぎず、本開示の範囲を限定するものではないことは理解されるはずである。

【0648】

以下の付番の段落は、さらなる本開示の側面を定義する。

段落28:(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257

10

20

30

40

50

、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有するが、ここで位置169でのWまたは配列番号1、2、もしくは3の位置169に対応するWはGによって置き換えられる;ここで位置306でのAまたは配列番号1、2、もしくは3の位置306に対応するAはVによって置き換えられる;および/または位置600でのGまたは配列番号1、2、もしくは3の位置600に対応するGはMによって置き換えられる。

10

【0649】

配列同一性または類似性は、同定されたポリペプチドと、少なくとも、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、もしくは少なくとも99%の、または100%の、同一性あるいは類似性であってもよい。

20

【0650】

段落29:アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(2E)-ビスホモファルネソール(ビスEEH)またはビスEEHを含むビスホモファルネソール異性体の混合物を、アンブラオキシドまたはアンブラオキシドを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277

30

40

50

、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、もしくは310と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ならびにここでSHC/HAC酵素バリエーションのアミノ酸配列は、配列番号1、2、3、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383に対し、配列番号1、2、もしくは3の位置W169、A306、および/またはG600に対応する位置にて、あるいは配列番号1、2、もしくは3のW169、A306、および/またはG600に対応する野生型SHC/HAC酵素のアミノ酸配列の位置にて、アミノ酸改変を有するが、ここで位置169でのWまたは配列番号1、2、もしくは3の位置169に対応するWはGによって置き換えられる;ここで位置306でのAまたは配列番号1、2、もしくは3の位置306に対応するAはVによって置き換えられる;および/または位置600でのGまたは配列番号1、2、もしくは3の位置600に対応するGはMによって置き換えられる。

10

20

30

40

50

【0651】

配列同一性または類似性は、同定されたポリペプチドと、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、もしくは少なくとも99%の、または100%の、同一性あるいは類似性であってもよい。

【0652】

段落30:段落28または29に従うプロセスであって、ここで:

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、

373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および/または

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる。

10

【0653】

態様において、段落30に従うプロセスは、次のものとする：

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

20

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、A、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる。

30

【0654】

態様において、段落30に従うプロセスは、次のものとする：

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、G、A、もしくはV、またはその機能的同等物によって置き換えられ、好ましくはここで位置169でのWは、Gによって置き換えられ、および/または

40

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる。

50

【0655】

態様において、段落30に従うプロセスは、次のものとする：

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置169でのWは、Gまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置306でのAは、Vまたはその機能的同等物によって置き換えられ、および/または

- 配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、または383の位置600でのGは、V、L、I、もしくはM、またはその機能的同等物によって置き換えられる。

【0656】

段落31:配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310の位置168でのアミノ酸がSであるか、あるいは配列番号1、2、3、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47、48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382もしくは383、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、

10

20

30

40

50

130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、または310の168に対応する野生型SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸がSである、先行する段落のいずれか1つに従うプロセス。

10

【0657】

段落32:先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここで

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1、4、5、6、または350と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号7、8、9、または386と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:M132R、A224V、I432T、A557T、R613Sを有し、ならびに以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有し、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号10、11、12、または385と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:M132R、A224V、I432Tを有し、ならびに以下の突然変異:W169G、A306V、およびG600Mの少なくとも1つを有する。

20

【0658】

配列同一性は、同定されたポリペプチドと、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%の同一性であってもよい。

30

【0659】

段落33:先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここで

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号23、304、359、または360と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W172G、A311V、およびG609Mの少なくとも1つを有し(Tel SHC/HACバリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号32、311、357、または358と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W196G、A335V、およびG629Mを有し(Scd SHC/HACバリエーション)、あるいは
- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号13、312、353、または354と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W222G、A368V、およびG667Mの少なくとも1つを有し(Zmo SHC1バリエーション)、あるいは

40

50

- SHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号15、313、355、または356と少なくとも70.0%の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ以下の突然変異:W177G、A321V、およびG619Mの少なくとも1つを有する(Zmo SHC2バリエーション)。

【0660】

配列同一性は、同定されたポリペプチドと、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%の同一性であってもよい。

【0661】

段落34:先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここでSHC/AHC酵素バリエーションは、配列番号4、5、6、7、8、9、10、11、12、305、306、304、302、311、312、313、353、354、355、356、357、358、359、360、315、316、317、318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、もしくは352を含むか、それになるか、または本質的にそれからなるアミノ酸配列を有する。

【0662】

段落35:先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここで本明細書に開示のSHC/HAC酵素バリエーションは次を呈する:

参照SHC酵素(例として、野生型SHC、たとえば配列番号1、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199、200、201、202、203、204、205、206、207、208、209、210、211、212、213、214、215、216、217、218、219、220、221、222、223、224、225、226、227、228、229、230、231、232、233、234、235、236、237、238、239、240、241、242、243、244、245、246、247、248、249、250、251、252、253、254、255、256、257、258、259、260、261、262、263、264、265、266、267、268、269、270、271、272、273、274、275、276、277、278、279、280、281、282、283、284、285、286、287、288、289、290、291、292、293、294、295、296、307、308、309、310によって表されるもの、または215G2 AacSHC、またはSHC#65、またはそのバリエーションが由来する親SHC酵素、たとえば配列番号2、3、47~48、49、50、51、52、53、54、361、362、363、364、365、366、367、368、369、370、371、372、373、374、375、376、377、378、379、380、381、382、もしくは383)と比較して、

- EEHに対する(またはビスEEHに対する)、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される基質特異性、
- (-)-アンブロックス(またはアンブラオキシド)に対する、ホモファルネソール基質またはビス-ホモファルネソール基質が使用されたときに増大される産物選択性、
- 基質の具体的な異性体に対する、ホモファルネソールまたはビス-ホモファルネソール以外の基質が使用されるとき(例として、エチル-ホモファルネソール、ヒドロキシファルネシルアセトン等 - 例えば夫々W02021/110858およびW02021/209482を見よ)に増大される特異性、
- 増大される産生能、および/または
- 反応の最初の3~6時間にわたる(または最初の4、5、もしくは6時間にわたる)、EEH(またはBisEEH)の変換の増大された程度、ならびにEEH(またはビスEEH)の増大された変換率。

10

【0663】

段落36:先行する段落のいずれか1つに定義されるとおりのSHC/HAC酵素バリエーションであって、好ましくはここでバリエーションは次を含む:

位置169でのG、または配列番号1、2、もしくは3の位置169に対応するG;

位置169でのG、または配列番号1、2、もしくは3の位置169に対応するG、および位置306でのV、または配列番号1、2、もしくは3の位置306に対応するV;あるいは

位置169でのG、または配列番号1、2、もしくは3の位置169に対応するG、および位置600でのM、または配列番号1、2、もしくは3の位置306に対応するM;あるいは

20

位置169でのG、または配列番号1、2、もしくは3の位置169に対応するG、および位置306でのV、または配列番号1、2、もしくは3の位置306に対応するV、および位置600でのM、または配列番号1、2、もしくは3の位置600に対応するM、

および/またはここで位置600でのG、または配列番号1、2、もしくは3の位置600に対応するGは、Mによって置き換えられる。

【0664】

段落37:段落36を除く先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここで酵素の変換は、約30℃~約50℃(例えば、約40℃から約50℃まで)の範囲にある温度にて、および/または約5~約6の範囲にあるpHにて起こる。

【0665】

30

段落38:段落36を除く先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここでプロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞を培養することを含む。

【0666】

段落39:段落38に従うプロセスであって、ここで組換え宿主細胞は、配列番号38、39、40、41、42、43、44、45、および/または46から選択される核酸配列を含む。

【0667】

段落40:段落36を除く先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここでEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物は、EE:EZ異性体混合物であり、好ましくはEE:EZ異性体混合物は、80:20の重量比率にある。

【0668】

40

段落41:段落36を除く先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここでSHC/HAC酵素バリエーションを産生する組換え宿主細胞の、EEHに対する、または80:20の重量比率にあるEE:EZ異性体混合物中のEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物に対する重量比率は、約2:1、1:1、または約0.5:1、または約0.1:1である。

【0669】

段落42:段落36を除く先行する段落のいずれかのプロセスにより得られるかまたは得ることができる、アモルファス形態または結晶形態の固体形態にある(-)-アンブロックス。

【0670】

段落43:布の仕上げ剤、洗面用具、美容用品、洗浄製品、洗剤製品、および/または石

50

醃製品などの、フレグランスあるいは化粧料あるいは消費者向製品の一部としての、請求項15の(-)-アンブロックスの使用。

【0671】

段落44:段落42の(-)-アンブロックスを含む、フレグランスまたは化粧料または消費者向製品。

段落45:段落36のSHC/HAC酵素バリエーションをコードする、核酸配列。

【0672】

段落46:段落45の核酸配列を含む、構築物。

段落47:段落45の核酸配列または段落46の構築物を含む、組換え宿主細胞。

【0673】

段落48:段落28、29、または31のいずれか1つに従う(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、プロセスは、SHC/HAC酵素バリエーションを使用し、(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含むホモファルネソール異性体の混合物を、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換することを含み、ここでSHC/HAC酵素バリエーションは、配列番号1~12、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、47~54、55~296、301~313、315~353、354~383と少なくとも30.0%の同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有し、ここで配列番号1の位置169でのWまたはその位置169に対応するWは、Gによって置き換えられる;配列番号1、2、もしくは3の位置306でのAまたはその位置306に対応するAは、Vによって置き換えられる;および/または配列番号1、2、もしくは3の位置600でのGまたはその600に対応するGは、Mによって置き換えられる。

【0674】

配列の同一性または類似性は、少なくとも31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%であってもよい。

【0675】

先行する段落のいずれか1つに従うプロセスであって、ここでプロセスは、工業規模で実行され、好ましくはここで生物変換体積は、少なくとも約100L、より好ましくは約1000L~約3000Lの範囲に、さらにいっそう好ましくは約10,000L、さらにいっそう好ましくは約100,000L、または約250,000Lでさえある。

【0676】

以下の付番の段落は、本開示のさらなる側面を定義する。

段落49:次を含むスクアレニン-ホペン-シクラーゼ(SHC)の酵素活性をもつタンパク質

a)配列番号1のAlicyclobacillus acidocaldariusの野生型SHC(野生型AacSHC)に対して突然変異したアミノ酸配列、ここで配列番号1の位置169でのWは、アミノ酸Gもしくは突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物によって置き換えられ、ここで突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物は、突然変異したアミノ酸配列のアミノ酸配列と38,0%から99,9%までのアミノ酸配列同一性を有し、または

b)野生型SHC(WT-SHC)に対して突然変異したアミノ酸配列、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、アミノ酸Gもしくは突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物によって置き換えられ、ここで突然変異したアミノ酸配列の機能的同等物は、突然変異したアミノ酸配列のアミノ酸配列と38,0%から99,9%までのアミノ酸配列同一性を有する。

【0677】

配列同一性は、同定されたポリペプチドと、少なくとも38%、39%、40%、41%、

42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、少なくとも81%、少なくとも82%、少なくとも83%、少なくとも84%、少なくとも85%、少なくとも86%、少なくとも87%、少なくとも88%、少なくとも89%、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%、または少なくとも99%、99.9%、または100%の同一性から成っていてもよい。

【0678】

段落50:配列番号1の野生型AacSHCに対して突然変異したアミノ酸配列は、配列番号315のアミノ酸配列である、段落49のタンパク質。

【0679】

段落51:WT-SHCは、*Acetobacter pasteurianus*(ApaSHC1、配列番号24)、*Burkholderia ambifaria*(BamSHC1、配列番号28、BamSHC2、配列番号29)、*Bradyrhizobium japonicum*(BjaSHCもしくはBjpSHC、配列番号119)、*Pelobacter carbinolicus*または*Syntrophotalea carbinolica* DSM2380(PcaSHC2、配列番号30)、*Rhodopseudomonas palustris*(RpaSHC1、配列番号31)、*Streptomyces coelicolor*(ScoSHC、配列番号32)、*Syntrophobacter fumaroxidans*(SfuSHC1、配列番号33)、*Teredinibacter turnerae*(TtuSHC、配列番号34)、*Zymomonas mobilis*(ZmoSHC1、配列番号13もしくは14、ZmoSHC2、配列番号15)、および*Thermosynechococcus elongatus*(TelSHC、配列番号23)のWT-SHCからなる群から選択される、段落49のタンパク質。

【0680】

段落52:配列番号13、14、15、23~24、28、29、30、31、32、33、34のWT-SHCに対して突然変異したアミノ酸配列は、配列番号302、303、304のアミノ酸配列である、段落49または51のタンパク質。

【0681】

段落53:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置169でのWは、Gによって置き換えられるか(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応する野生型TelSHC(配列番号23)のアミノ酸配列の位置172でのWは、Gによって置き換えられる(配列番号302、304)。

【0682】

段落54:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置600でのGは、A、V、L、I、およびMからなる群から選択されるアミノ酸によって置き換えられるか(配列番号318、319、320、321、322、323、324、325、326、327、328、329、330、331、332、305)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのG600に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけGは、A、V、L、I、およびMからなる群から選択されるアミノ酸によって置き換えられる。

【0683】

段落55:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置306でのAは、Vによって置き換えられるか(配列番号333、334、335、336、337、338、339、340、341、342、343、344、345、346、347、350、351、352)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのA306に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけPもしくはCは、Vによって置き換えられる。

【0684】

10

20

30

40

50

段落56:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置169でのWは、Gによって置き換えられるか(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、またはここでb)配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、もしくはCは、Sによって置き換えられる。

【0685】

段落57:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

10

【0686】

段落58:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、またはCは、Sによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

20

【0687】

段落59:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここでa)配列番号1の野生型AacSHCの位置169でのWは、Gによって置き換えられるか(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、(またはb)ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、もしくはCは、Sによって置き換えられる。

【0688】

段落60:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

30

【0689】

段落61:突然変異したアミノ酸配列を含む、先行する段落の1つのタンパク質であって、ここで配列番号1の野生型AacSHCのW169に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのWは、Gによって置き換えられ(配列番号315、318、319、320、321、322、333、334、335、336、337、350、305)、配列番号1の野生型AacSHCのS168に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけY、Q、A、またはCは、Sによって置き換えられ、かつ配列番号1の野生型AacSHCのY420に対応するWT-SHCのアミノ酸配列の位置でのアミノ酸、とりわけFは、Yによって置き換えられる。

40

【0690】

段落62:先行する段落のいずれか1つのタンパク質をコードする核酸配列、とりわけ配列番号349において同定される核酸配列。

【0691】

段落63:段落62の核酸配列を含む、発現カセット。

段落64:段落62の核酸配列または請求項63の発現カセットを含む、ベクター。

【0692】

50

段落65.段落64のベクター、または段落63の発現カセット、または段落62の核酸配列を含む、宿主細胞。

【0693】

段落66:SHCの酵素活性をもつ生体触媒を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

- a)段落49~61のいずれか1つに従うタンパク質をコードする核酸配列を含む、段落65の宿主細胞を提供すること、
- b)ステップa)の宿主細胞を、タンパク質の発現を可能にする条件下で培養培地中で培養すること、および
- c)生体触媒、とりわけ発現されたタンパク質、または発現されたタンパク質を含む宿主細胞を得ること。

10

【0694】

段落67.生体触媒、とりわけ段落66のプロセスに従って調製される生体触媒であって、ここで生体触媒は、段落49~61のいずれか1つに従うタンパク質、段落49~61のいずれか1つに従うタンパク質を含む宿主細胞、段落49~61のいずれか1つに従うタンパク質を含む、宿主細胞ライセート、凍結乾燥された宿主細胞、宿主細胞抽出物、または宿主細胞画分である。

【0695】

段落68.(-)-アンブロックスを含む組成物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

20

- x)ホモファルネソール、反応媒体、および段落67の生体触媒を提供すること、
- y)提供されたホモファルネソールを反応媒体および段落19の生体触媒と混合し、およびホモファルネソールを、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z)(-)-アンブロックスを含む組成物を得ること。

【0696】

段落69.ヒトまたは動物への使用のための芳香剤(aroma)を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

- i)段落68に従うプロセスを実施すること、
- j)ステップi)で得られた(-)-アンブロックスおよび少なくとも1つのさらなる構成要素を含む組成物を混和すること、
- l)組成物および少なくとも1つのさらなる構成要素を含む、ヒトまたは動物への使用のための芳香剤を得ること。

30

【0697】

段落70.最大で2つまでもしくは2つ以上のSHC活性部位突然変異、および/またはSHC活性部位変異以外に最大で2つまでもしくは2つ以上の部位突然変異、を含む生体触媒であって、ここで活性部位突然変異は、表10に列挙される活性部位アミノ酸位置(AacSHCに基づく)から選択され、活性部位の位置36、168、169、261、306、307、312、365、366、420、489、600、607、609、および/または612、好ましくは169、261、312、365、489、600、609、および/または612を含み、かつここで活性部位突然変異以外の突然変異は、本明細書に開示の表7および/または表8および/または表9および/または表18に列挙される部位突然変異から選択され、好ましくはM132Rおよび/またはI432Tあるいはその機能的同等物を含み、ここで生体触媒は、タンパク質、タンパク質を含む宿主細胞、タンパク質を含む宿主細胞ライセート、凍結乾燥された宿主細胞、宿主細胞抽出物、または宿主細胞画分である。一例として、WO2016/170099の図19は、SHC結晶構造上、SHC/HACバリエーション101A10、111C8、および215G2(M132R、I432T、およびA224Vを含む)において同定された非活性部位突然変異の場所を示す。AacSHC結晶構造のCAVER分析は、本明細書に記載されるような有益な活性部位突然変異および活性部位突然変異以外の部位突然変異を含むSHCバリエーションを使用して、着目した産物の調製に有用な活性部位突然変異以外の、有用な活性部位突然変異および部

40

50

位突然変異を同定するために実施され得る。

【0698】

段落71.(-)-アンブロックスを含む組成物または(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

- x) ホモファルネソール、反応媒体、および段落70の生体触媒を提供すること、
- y) 提供されたホモファルネソールを反応媒体および段落22の生体触媒と混合し、およびホモファルネソールを、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) (-)-アンブロックスを含む組成物を得ること。

【0699】

段落72.(-)-アンブロックスを含む組成物または(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

- x) ホモファルネソール、反応媒体、および表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒を提供すること
- y) 提供されたホモファルネソールを、反応媒体と、表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒とともに混合し、およびホモファルネソールを、ホモファルネソールを(-)-アンブロックスへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) (-)-アンブロックスを含む組成物を得ること。

【0700】

段落73.アンベルケタールを含む組成物またはアンベルケタールを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

- x) ヒドロキシファルネシルアセトン、反応媒体、および表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒を提供すること
- y) 提供されたヒドロキシファルネシルアセトンを、反応媒体と、表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒とともに混合し、およびヒドロキシファルネシルアセトンを、ヒドロキシファルネシルアセトンをアンベルケタールへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) アンベルケタールを含む組成物を得ること。

【0701】

段落74.アンブラオキシドを含む組成物またはアンブラオキシドを含む混合物を調製するためのプロセスであって、以下のステップを含む:

- x) (2-E)-ビスホモファルネソール(ビスEEH)、反応媒体、および表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒を提供すること
- y) 提供されたビスEEHを、反応媒体と、表2、3、7、8、9、16、および/または18のいずれか1つに開示される生体触媒とともに混合し、およびビスEEHを、ビスEEHをアンブラオキシドへ変換するための反応条件下で生体触媒と反応させること、ならびに
- z) アンブラオキシドを含む組成物を得ること。

【0702】

段落75.(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物を調製するためのプロセスであって、ここで(3E,7E)-ホモファルネソール(EEH)またはEEHを含む立体異性体の混合物は、(-)-アンブロックスまたは(-)-アンブロックスを含む混合物へ酵素的に変換されるが、ここで酵素的変換は、(-)-アンブロックスの産生に好適な反応条件下でSHC/HAC酵素を使用して実行され、ならびにここでEEHを含む立体異性体の混合物は、以下の[(3E,7E)および[(3Z,7E)]および/または[(3E,7E)および(3E,7Z)]および/または[(3Z,7E)、(3E,7E)、および(3E,7Z)](また夫々[EE:EZ]、[EE:ZE]、および[EE:EZ:ZE]とも指定される)からなる群の1以上から選択されるホモファルネソール異性体から本質的になり、ならびにここでSHC/HAC酵素ポリペプチド配列は、表2、表3、表7、表8、表9、表16、または表18から選択されるSHC酵素またはSHC酵素バリエーション、および/または表2、表3、表7、表8、表9、表16、もしくは表18から選択されたとおりのS

10

20

30

40

50

HCアミノ酸配列またはSHCバリエーションアミノ酸配列と少なくとも30%、少なくとも40%の同一性、少なくとも50%の同一性、または少なくとも60%の同一性、または少なくとも70%の同一性、または少なくとも80%の同一性、または少なくとも90%の同一性、または少なくとも95%の同一性、または少なくとも96%の同一性、または少なくとも97%の同一性、または少なくとも98%の同一性、または少なくとも99%の同一性をもつ配列からなる群から選択される。

【0703】

例

例1

生体触媒の産生

*Escherichia coli*におけるスクアレンホペンシクラーゼ酵素産生のため、所望の野生型またはバリエーションのSHC酵素をコードする遺伝子を、(市販の(例えば、Merck Milliporeからの)であって、かつWO 2016/170099の図21の配列番号179に開示されるとおりの)プラスミドpET-28a(+))中へ挿入したが、ここで前記遺伝子はIPTG誘導性T7プロモーターの制御下にある。プラスミドを、標準的な熱ショック形質転換手順を使用して*E. coli*株BL21(DE3)(市販)に形質転換した。

【0704】

培養培地

生体触媒産生のために使用された最小培地は次を含有していた:

- 10% 10xクエン酸/リン酸塩緩衝剤(脱イオン水中、133g/l KH_2PO_4 、40g/l $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 、17g/l クエン酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$ 、32% NaOHを使用してpHを6.8へ調整した)、
- 2.43% MgSO_4 溶液(脱イオン水中50% w/v $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、
- 0.01%微量元素溶液(脱イオン水中、50g/l $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20g/l $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3g/l H_3BO_3 、0.9g/l $\text{MnSO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.1g/l CoCl_2 、80g/l CuCl_2 、240g/l $\text{NiSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100g/l KI、1.4g/l $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、1g/l $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$)、
- 0.01%チアミン溶液(脱イオン水中2.25g/l チアミン $\cdot\text{HCl}$)、
- 2%グルコース溶液(脱イオン水中20% w/v グルコース)。

【0705】

クエン酸/リン酸塩緩衝剤は最初にオートクレーブすることによって滅菌し、その後、他の成分は、オートクレーブするかまたはフィルター滅菌($0.2\mu\text{m}$)によって滅菌された滅菌溶液から加えた。

【0706】

発酵

発酵を750ml InforsHT反応器中で稼働させた。発酵槽へ168ml脱イオン水を加えた。反応槽に、要求されるすべてのプローブ(pO_2 、pH、試料採取、抗泡)、C+N給送瓶および水酸化ナトリウム瓶を備え付け、オートクレーブした。オートクレーブした後、次を加えた:

- 20ml 10xリン酸塩/クエン酸緩衝剤
- 14ml 50%グルコース
- 0.53ml MgSO_4 溶液
- 2ml $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液(脱イオン水中50%(w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$)
- 0.020ml 微量元素溶液
- 0.400ml チアミン溶液
- 0.200ml カナマイシン溶液(50mg/ml)

【0707】

稼働パラメータは以下のとおりであった: $\text{pH}=6.95$ 、 $\text{pO}_2=40\%$ 、 $T=30^\circ\text{C}$ 、300rpm。カスケード:rpm 300、min 300、max 1000、流れ(l/分) 0.1、min 0、max 0.6。消泡制御:1:9。

【0708】

種培養物をLB培地(+カナマイシン)中 37°C 、220rpmにて8h成長させた。発酵槽に、

10

20

30

40

50

OD_{650nm}が0.4~0.5になるまでこの種培養物から植菌した。発酵を最初にバッチモードで11.5h稼働させた後、滅菌後に以下:17.5ml (NH₄)₂SO₄溶液、1.8ml MgSO₄溶液、0.018ml微量元素溶液、0.360mlチアミン溶液、0.180mlカナマイシン溶液が加えられた給送溶液(滅菌グルコース溶液(143ml H₂O+35gグルコース)でC+N給送を開始した。給送をおよそ4.2ml/hの一定流速にて稼働させた。培養中のC-およびN-供給源の利用可能性を評価するためグルコースおよびNH₄⁺の測定を外部から行った。大抵、グルコースレベルは極めて低いままである。

【0709】

培養物を計およそ25時間成長させたが、これらは典型的にはOD_{650nm}が40~45に達していた。次いでSHC産生を、発酵槽へIPTGを1mMの濃度まで加えることによって誘導し、30℃およびpO₂=20%にておよそ16h続けた。誘導の終了時、細胞を遠心分離によって収集し、クエン酸/リン酸ナトリウム緩衝剤(pH5.6)で洗浄して、さらなる使用までペレットとして4℃または-20℃にて保管した。

10

【0710】

例2

SHCバリエーションに最適化された反応条件の設定

SHCバリエーションのための反応条件は、温度、pH、およびSDS濃度に関して個々に最適化した。生体触媒は、例1に記載のとおり発酵によって調製して、全細胞反応に使用した。使用されたホモファルネソール供給原料は、80:20のEEH:EZH比率であった。

【0711】

20

4、8、または16g/l E,E-ホモファルネソールとOD_{650nm}が10にてロードされた細胞とを含有する2~4ml体積の反応を、0.1Mクエン酸/リン酸ナトリウム、または0.1M酢酸/酢酸ナトリウム、または0.1Mコハク酸/NaOH緩衝剤pH5.2~7.0中、25℃から55℃まで及ぶ温度にて0.005%から0.095%まで及ぶ濃度でのSDSの存在下、5.2から6.6まで及ぶpHにて、および一定の攪拌下(Heidolph synthesis 1 Liquid 16もしくは24(800rpm)、またはRadleys Carousel 12 Plus/Monoblock 16(200rpm))で行った。

【0712】

我々は、数種の突然変異を有するAacSHCバリエーションが、EEHに対する改善された基質特異性および/または(-)-アンブロックスに対する産物選択性を呈し、これにより改善されたEEH変換率がもたらされることを発見した。これらの突然変異は次である:

30

突然変異W169Gは、P1バリエーションに導入される

突然変異W169GおよびG600Mは、P2バリエーションに導入される

突然変異W169G、A306V、およびG600Mは、P3バリエーションに導入される

(これらの位置は、配列番号1の位置に対応する)

【0713】

P1、P2、またはP3バリエーションの突然変異は、次に導入されていた:

- 野生型Aac SHCは配列番号1によって表され、次へ繋がる:

○配列番号4によって表されるAac SHC P1バリエーション、

○配列番号5によって表されるAac SHC P2バリエーション、

○配列番号6によって表されるAac SHC P3バリエーション、

40

- SHC#65バリエーションは配列番号2によって表され、次へ繋がる:

○配列番号7によって表されるSHC#65 P1バリエーション、

○配列番号8によって表されるSHC#65 P2バリエーション、

○配列番号9によって表されるSHC#65 P3バリエーション、

- 215G2 SHCバリエーションは配列番号3によって表され、次へ繋がる:

○配列番号10によって表される215G2 SHC P1バリエーション、

○配列番号11によって表される215G2 SHC P2バリエーション、

○配列番号12によって表される215G2 SHC P3バリエーション、

【0714】

50

P1、P2、およびP3バリエーションの突然変異を導入することにより、考慮されたSHCバリエーションに依存して酵素活性に対し有意な影響が与えられた。同じ効果は、表7および/または表8に列挙されるとおりの他のSHCバリエーションについても期待されてもよいことが想定され得る。最適化されたものとして定義された反応条件は、EEH生物変換において高基質濃度にて使用される緩衝剤である、0.1 M コハク酸/NaOH緩衝剤において確認/調整(pH)された。

【0715】

結果(表15)は、SHCバリエーションのE,E-ホモファルネソール変換における相対性能の慎重な評価のために、反応条件を個々の最適値(optima)に正しく設定することの重要性を指し示した。

【0716】

表15:SHCバリエーションに最適化された反応条件。有用な範囲および最適な値。

【表15】

SHC酵素	温度(°C)	pH ¹	[SDS](w/v %) ²
AacSHC ³	55	6.0	0.035
AacSHC P1	40-45/45	6.0-6.4/6.2	0.005-0.050/0.035
AacSHC P2	40-50/45	5.6-5.8/5.6	0.020-0.050/0.035
AacSHC P3	45-50/50	5.8-6.6/6.4	0.005-0.030/0.020
215G2SHC ³	35	5.4	0.060
215G2SHC P1	35-40/35	6.2-6.6/6.4	0.020
215G2SHC P2	30-35/35	5.8-6.0/6.0	0.020
215G2SHC P3	35-40/40	6.0-6.6/6.4	0.035
SHC#65 ⁴	45	5.6	0.050
SHC#65 P2	40-45/40	5.4-6.4/5.6	0.030-0.040/0.030
SHC#65 P3	45-50/45	5.4-6.2/5.8	0.010-0.030/0.025

¹クエン酸/リン酸ナトリウム緩衝剤において測定されたとおり、²OD_{650nm}が10での細胞を含有する反応において測定されたとおり、³WO2016/170099において公開されたとおり、⁴WO2021/110848において公開されたとおり。

【0717】

例3

E,E-ホモファルネソール環化反応におけるSHCバリエーションの相対性能

P1、P2、およびP3バリエーションの突然変異が、野生型AacSHCおよび215G2SHCのバックグラウンドに導入されたときのE,E-ホモファルネソール変換に対する影響を調査した。反応は、一定に攪拌した4ml体積において(Heidolph Synthesis 1 Liquid 16、800rpm)、個々に最適化された反応条件(T、pH、SDS)を適用して行った。使用されたホモファルネソール供給原料は、80:20のEEH:EZH比率であった。

【0718】

AacSHCのP1、P2、およびP3バリエーションでのEEH変換は、親の野生型酵素のそれよりも飛躍的に増大した(図1を見よ)。215G2SHCのP1、P2、およびP3バリエーションは、215G2SHCよりも有意に増大したEEH変換を示した(図1を見よ)。

【0719】

例4

P1、P2、およびP3 SHCバリエーションの基質特異性および産物選択性(ホモファルネソール)

P1、P2、およびP3バリエーションを、野生型AacSHC、215G2SHC、およびSHC#65に導入したときの基質特異性および産物選択性に対する影響を調査した。反応(4ml体積)は、8g/l EEHおよびOD_{650nm}が10までの細胞を含有し、一定に攪拌して(Heidolph Synthesis 1 Liquid 16、800rpm)、個々に最適化された反応条件(T、pH、SDS)を適用して行った。使用されたホモファルネソール供給原料は、80:20のEEH:EZH比率をもつ異性体の混合物であった。

【0720】

図2は、Eichhorn et al. Adv. Synth. Catal. (2018), 360, 2339-2351において、

およびWO2016/170099において公開されるとおり、EE異性体とEZ異性体との混合物からなるホモファルネソールがSHCで環化されたときに産生される反応産物を示す。

【0721】

野生型AacSHC、215G2SHC、およびSHC#65によって触媒されるホモファルネソール環化反応における、ならびにこれらの酵素のP1、P2、およびP3バリエーションにおける反応産物分布の分析により、P1、P2、およびP3バリエーションの増大された基質特異性および産物選択性が示された。

親酵素は、EEHとEZHとの両方を、図2に示される産物へ変換した。

【0722】

以下の結論が図3から引き出され得る：

AacSHCのP1バリエーションでは、反応産物中の化合物II、III、およびIVの強烈な(strong)低減が観察されたが、これはE,E-ホモファルネソールに対する特異性が増大したこと、E,Z-ホモファルネソールが効率的に環化されにくいことを指し示した。E,E-ホモファルネソール環化の主産物が(-)-アンブロックスであったこと、反応産物が化合物IVをまったく含有しないかまたはほとんど含有しないことから、(-)-アンブロックスへの産物選択性は増大した。AacSHCのP2およびP3バリエーションでは、E,Z-ホモファルネソール環化からより多くの化合物IIIが産生されたことから、基質特異性がわずかに低下したが、(-)-アンブロックスへの産物特異性は高いままで、反応産物には化合物IVがまったく存在しないかまたはほとんど存在しなかった。概して、バリエーションP1は、最も高い基質特異性を示し、バリエーションP2およびP3は、バリエーションP1と比較してE,Z-ホモファルネソール変換の増加を示した。

【0723】

215G2SHCのP1、P2、およびP3バリエーションもまた、E,E-ホモファルネソールに対する基質選択性および(-)-アンブロックスに対する産物選択性を有意に増大させたことを示した。AacSHCのP1、P2、およびP3バリエーションで観察されたとおり、215G2 P2およびP3は、バリエーション215G2 SHC P1と比較してより低い基質特異性を示した。

【0724】

SHC#65のP1、P2、およびP3バリエーションに突然変異を導入すると、E,E-ホモファルネソールに対する基質特異性および(-)-アンブロックスに対する産物選択性は強烈に増大したが、この選択性は3つのSHC#65バリエーション間でほぼ同じままであった。

【0725】

例5

125g/l E,E-ホモファルネソール生物変換におけるP1、P2、およびP3 AacSHCバリエーションの性能

選択されたSHC酵素をコードする遺伝子を持つプラスミドで形質転換されたE.coli株の発酵によって産生された生体触媒を、125g/l E,E-ホモファルネソール生物変換に使用した。使用されたホモファルネソールストックは、80:20のEEH:EZH比率であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、細胞懸濁液のおよそ1gアリコートを上遠心分離機において遠心分離し(13,000rpm)、上清を慎重に捨て、細胞ペレットの(三通りの)質量を秤量することによって決定した。

【0726】

25ml反応をRadleys Carousel Plus/Monoblock 16において行った。それらは125g/l E,E-ホモファルネソール、250g/l細胞を含有しており、0.1Mコハク酸またはクエン酸/リン酸ナトリウム緩衝剤において行った。温度、pH、およびSDS濃度(SDS:細胞比率)を、各バリエーションにとって最適であるとして個々に定義された条件に従い設定した。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にていつもどおりに測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

【0727】

図4は、バリエーションのEEH変換率が、親の野生型AacSHC酵素のそれ(15%)と比較して著しく(バリエーションに応じて50%から90%まで)増加したことを実証する。

【0728】

例6

125g/l E,E-ホモファルネソール生物変換における215G2 P2バリエーションおよびSHC#65 P2バリエーションの性能

選択されたSHC酵素をコードする遺伝子を持つプラスミドで形質転換されたE.coli株の発酵によって産生された生体触媒を、125g/l E,E-ホモファルネソール生物変換に使用した。使用されたホモファルネソールストックは、80:20のEEH:EZH比率であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、細胞懸濁液のおよそ1gアリコートで遠心分離機において遠心分離し(13,000rpm)、上清を慎重に捨て、細胞ペレットの(三通りの)質量を秤量することによって決定した。

10

【0729】

25ml反応をRadleys Carousel Plus/Monoblock 16において行った。それらは125g/l E,E-ホモファルネソール、250g/l細胞を含有しており、温度、pH、およびSDS濃度(SDS:細胞比率)に関して最適と定義された条件下で0.1Mコハク酸またはクエン酸/リン酸ナトリウム緩衝剤中で行った。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

【0730】

215G2SHC中へP2バリエーション突然変異を導入すると、EEH変換が飛躍的に改善された:<90%変換が、親215G2SHC酵素でのおよそ48hの代わりに、24hで得られた。バリエーション215G2 P2およびSHC P2は、SHCバリエーションのSHC#65と同じように働いた(図5を見よ)。

20

【0731】

例7

P1、P2、およびP3 SHCバリエーションの基質特異性および産物選択性(ホモファルネソール)

選択されたSHC酵素をコードする遺伝子を持つプラスミドで形質転換されたE.coli株の発酵によって産生された生体触媒を、125g/l E,E-ホモファルネソール生物変換に使用した。使用されたホモファルネソールストックは、80:20のEEH:EZH比率であった。25ml反応をRadleys Carousel Plus/Monoblock 16において行った。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、細胞懸濁液のおよそ1gアリコートで遠心分離機において遠心分離し(13,000rpm)、上清を慎重に捨て、細胞ペレットの(三通りの)質量を秤量することによって決定した。

30

【0732】

反応は125g/l E,E-ホモファルネソール、250g/l細胞を含有しており、温度、pH、およびSDS濃度(SDS:細胞比率)に関して最適と定義された条件下で0.1Mコハク酸またはクエン酸/リン酸ナトリウム緩衝剤中で行った。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

【0733】

図6は、試験されたバリエーションの各々での反応産物の組成、E,E-ホモファルネソールおよびE,Z-ホモファルネソールの変換を示す。215G2SHCおよびSHC#65中へP1、P2、およびP3バリエーションの突然変異を導入すると、E,Z-ホモファルネソールの変換が強烈に低減し、これによってバリエーション酵素のE,E-ホモファルネソールに対する基質選択性が増大した。突然変異はまた、酵素バリエーションの産物特異性も強烈に増大させた:化合物IVは、E,E-ホモファルネソールからまったくまたはほとんど産生されず、化合物IIIは、E,Z-ホモファルネソール環化の唯一またはほとんど唯一の産物であった。

40

【0734】

例8

増加したE,E-ホモファルネソール濃度での生物変換

使用されたホモファルネソールストックは、80:20のEEH:EZH比率であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、細胞懸濁液のおよそ1gアリコートで遠心分離機において遠心分離し(13,000rpm)、上清を慎重に捨て、細胞ペレットの(三通りの)質量を

50

秤量することによって決定した。

【0735】

20ml反応をRadleys Carousel Plus/Monoblock 16において稼働させた(一定の攪拌)。それらは250g/l E,E-ホモファルネソール、SHCバリエーションのSHC#65またはSHC#65 P2を産生している250g/l細胞を含有しており、温度、pH、およびSDS濃度(SDS:細胞比率)に関して最適と定義された条件下で0.1Mコハク酸またはクエン酸/リン酸ナトリウム緩衝剤中で行った。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

【0736】

SHC#65とSHC#65 P2バリエーションとの両方でおおよそ同じレベルのE,E-ホモファルネソール変換が達成されたが、SHC#65のE,E-ホモファルネソールに対して増大された基質選択性は、SHC#65と比較してより速い変換を可能にした。

【0737】

例9

SHC#65およびSHC#65 P2 SHCバリエーションで細胞:基質比率を低減させる

使用されたホモファルネソールストックは、80:20のEEH:EZH比率であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、細胞懸濁液のおおよそ1gアリコートを上遠心分離機において遠心分離(13,000rpm)、上清を慎重に捨て、細胞ペレットの(三通りの)質量を秤量することによって決定した。

【0738】

SHCバリエーションSHC#65での反応は、DASBox Fermenter(一定の攪拌)中300ml体積において行い、SHC#65 P2 SHCバリエーションでの反応は、Radleys Carousel Plus/Monoblock 16フラスコ(一定の攪拌)中20ml反応において行った。それらは、250g/l E,E-ホモファルネソールと、SHCバリエーションSHC#65 P2を産生している150、125、もしくは100g/l細胞と、または300g/l E,E-ホモファルネソールと、SHC#65を産生している300、270、もしくは220g/l細胞とのいずれかを含有した。反応を、温度、pH、およびSDS濃度(SDS:細胞比率)に関して最適と定義された条件下、0.1Mコハク酸(SHC#65)またはクエン酸/リン酸ナトリウム(SHC#65 P2)緩衝剤中で行った。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

【0739】

結果(図8を見よ)は、SHCバリエーションSHC#65を産生する細胞のグラムあたりおおよそ1.4g E,E-ホモファルネソールを変換することが実行可能であったことを指し示した。SHC#65 P2 SHCバリエーションを産生する細胞を使用したときは、この値を、細胞のグラムあたりおおよそ少なくとも約2.2g E,E-ホモファルネソールまで増加させた。これは、SHC#65 P2の、E,E-ホモファルネソールに対して増大された基質選択性に起因し得る。

【0740】

第2の一連の調査において、生物変換を、250g/l EEHとともに、およびSHC#65 P2バリエーションを産生している細胞とともに、上に記載のとおりに行った:[細胞]:[EEH]比率をさらに0.3、0.2、および0.1の値まで低下させた。反応時間を、E,E-ホモファルネソール変換がプラトーに達する可能性を見越して、おおよそ200hまで延長した。おおよそ98%EEH変換が0.3の[細胞]:[EEH]比率で、おおよそ84%EEH変換が0.2の[細胞]:[EEH]比率で、おおよそ59%EEH変換が0.1の[細胞]:[EEH]比率で得られた。0.1の[細胞]:[EEH]比率での反応において達したプラトーは、適用された反応条件下で細胞のグラムあたりおおよそ5.9gのE,E-ホモファルネソールを変換する可能性を指し示した。これはSHC#65よりも2.7倍の改善を表す。

【0741】

例10

GC-FID分析

試料を、それら含量の基質および反応産物中の定量化のため、適切な体積のtert-ブチ

10

20

30

40

50

ルメチルエーテル(MBTE/tBME)で抽出した。溶媒画分を、ガスクロマトグラフィーでの分析に先立ち水相から遠心分離によって分離した。1 μ lの溶媒相を30 m x 0.32 mm x 0.25 μ m Zebtron ZB-5カラム上へ注入した(分割比率10)。カラムを一定の流れ(4 ml/min H₂)にて、温度勾配:100℃、15℃/min~200℃、120℃/min~240℃、240℃にて4 minで、展開した。吸込温度:250℃、検出器温度:250℃。これにより、EEHとEZ Hとの分離、ならびに(-)-アンブロックスとE,E-およびE,Z-ホモファルネソール環化から生じた他の3反応産物とに対応するピークの分離がもたらされた。

【0742】

E,E-ホモファルネソールおよびE,Z-ホモファルネソールの変換は、EEHまたはEZ Hの環化産物に対応するピークの面積と、EEHまたはEZ Hの基質ピーク面積とから、以下の式で算出した:

$$\text{EEH変換(\%)} = 100 \times (\text{面積}_{\text{EEH産物}} / (\text{面積}_{\text{EEH産物}} + \text{面積}_{\text{EEH}}))$$

$$\text{EZ H変換(\%)} = 100 \times (\text{面積}_{\text{EZ H産物}} / (\text{面積}_{\text{EZ H産物}} + \text{面積}_{\text{EZ H}}))$$

【0743】

例11

スクアレノペンシクラゼのアミノ酸配列のアラインメント

スクアレノペンシクラゼ酵素のための供給源微生物およびアミノ酸配列受託番号を表16に列挙する。

【0744】

表16:スクアレノペンシクラゼ酵素。供給源微生物およびアミノ酸配列受託番号。受託番号は、別様に言及されない限りGenbankである。

【表16】

略語	供給源の微生物	受託番号	配列番号
AacSHC	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	ACV59449.1	1
ApaSHC1	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	ASC07046.1	24
BamSHC1	<i>Burkholderia ambifaria</i>	AJY25620.1	28
BamSHC2	<i>Burkholderia ambifaria</i>	ABI91648.1	29
BjaSHC (or BjpSHC)	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	ABQ33590.1	16
BmeSHC	<i>Bacillus megaterium</i>	ADF38987.1	25
GmoSHC	<i>Gluconobacter morbifer</i>	EHM69691.1	22
PcaSHC2	<i>Pelobacter carbinolicus</i> または <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380	ABA87615.1	30
PmeSHC	<i>Pseudomonas mendocina</i>	A0A0X1SYK9 ¹	296
RpaSHC1	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ABJ08391.1	31
ScoSHC	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CAB39697.1	32
SfuSHC1	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	ABK17672.1	33
TeSHC	<i>Thermosynechococcus elongatus</i>	BAC09861.1	23
TtuSHC	<i>Teredinibacter turnerae</i>	ACR13362.1	34
ZmoSHC1	<i>Zymomonas mobilis</i>	AVZ42714.1	13
ZmoSHC2	<i>Zymomonas mobilis</i>	AHJ71916.1	15

¹ UniProtKB

【0745】

図9は、CLUSTAL O(1.2.4)で調製された表3に列挙されているスクアレノペンシクラゼ酵素のアミノ酸配列アラインメントを示す。*Alicyclobacillus acidocaldarius*(AacSHC)配列の位置169、306、および600でのアミノ酸は、黒色背景上に白色で強調されている。位置169でのWは、位置600でのGと同様に、アラインされたアミノ酸配列を通してほぼ厳重に(16配列のうち15配列に)保存されており、1つの単一保存的置換である。位置306でのアミノ酸は、あまり保存されていない(16配列のうち9配列)。

【0746】

例12 P2 SHCバリエーションの基質特異性および産物選択性(ビス-ホモファルネソール)

P2突然変異が基質特異性および産物選択性に与える影響を、アンブラオキシド産生用のビス-ホモファルネソールの環化のためにSHC#65に導入されたときに調査した。使用されたビス-ホモファルネソール供給原料のEE:EZ比率は、66:34であった。

【0747】

反応(3ml体積)は、4g/l E,E-ビス-ホモファルネソールおよびOD_{650nm}が10までの細胞を含有していた。反応は、一定に攪拌して(Heidolph Synthesis 1 Liquid 24、800rpm)行った。SHC#65での反応は、0.07% SDS存在下pH5.6および45℃にて行った。SHC#65 P2での反応は、0.03% SDS存在下pH6.2および35℃にて行った。

【0748】

反応は経時的に試料採取してMTBEで抽出し、それらの、E,E-ビス-ホモファルネソール、E,Z-ビス-ホモファルネソール、化合物X、XI、XII、およびXIII(表12に示されるとおりの反応産物)の含量をGC-FIDによって分析した。ホモファルネソールの変換は、例10に指し示されるとおりに算出した。

【0749】

SHC#65バックグラウンドにおいてP2突然変異を含む新しいバリエーションは、E,E-ビス-ホモファルネソールの増大した変換を呈する(図10を見よ)。

【0750】

SHC#65 P2バリエーションの、SH#65と比較した、ビス-ホモファルネソールのE,E異性体に対するより高い特異性、およびアンブラオキシドに対するより高い産物特異性が確認された。E,E-ビス-ホモファルネソールは、SHC#65 P2で、E,Z-ビス-ホモファルネソールよりも優先的に変換された。E,E-ビス-ホモファルネソール環化(X+XII)から生じる反応産物中のアンブラオキシド(X)の割合が増加した:SHC#65でのおよそ90:10 X:XIIと比較して、SHC#65 P2ではおよそ95:5であった(表17)。

【0751】

E,Z-ビス-ホモファルネソール環化に関する産物特異性が増大したのみならず、E,Z-ビス-ホモファルネソール環化の結果として化合物XIIIはまったくまたはほとんど生じず、化合物XIのみが検出された(表17)。

【0752】

全体的に、基質特異性および産物選択性に関する所見は、ホモファルネソールに関し他の例に記載されたものと合致していた。P2突然変異の効果は、E,E-ホモファルネソール以外の基質(E,E-ビス-ホモファルネソールはその一例)へも伝わり得ると結論付けられた。ここで得られた利益は、他の基質(例として、W02021/209482に定められるとおりのアンベルケタール産生のためのヒドロキシファルネシルアセトンの環化のための基質)にも転用され得るものと想定され得る。

【0753】

表17:SHC酵素バリエーションでのビス-ホモファルネソールの環化。ビス-ホモファルネソールを、SHC#65およびSHC#65 P2で環化させた。反応産物(化合物X、XI、XII、XIIIの混合物)の組成は、各化合物について、総反応産物のパーセントとして、およびE,E-ビス-ホモファルネソール(X+XII)とE,Z-ビス-ホモファルネソール(XI+XIII)との結果として生じる産物対の和として、指し示される。

【表17】

SHC 酵素	ビス-ホモファルネソール変換 (%) ¹	反応産物 (総反応産物の%)					
		X	XI	XII	XIII	X+XII	XI+XIII
SHC#65	85.1	70.5	17.0	8.2	4.3	78.7	21.3
SHC#65 P2	86.5	80.9	14.7	4.4	0.0	85.3	14.7

¹ 反応の24h後のEE異性体とEZ異性体との両方の総変換。

【0754】

例13

P1突然変異の、wt SHC酵素におけるホモファルネソール変換および産物選択性に与える影響。

P1突然変異が、ホモファルネソール変換および(-)-アンブロッックスの産物選択性に与

える影響を、AacSHC(配列番号1)、ZmoSHC1(配列番号13)、ZmoSHC2(配列番号15)、TelSHC(配列番号23)、およびScoSHC(配列番号32)に導入したときに調査した。

- 配列番号4によって表されるAacSHC P1バリエーション(W169G突然変異)、
- 配列番号312によって表されるZmoSHC1 P1バリエーション(W222G突然変異)
- 配列番号313によって表されるZmoSHC2 P1バリエーション(W177G突然変異)
- 配列番号304によって表されるTelSHC P1バリエーション(W172G突然変異)
- 配列番号311によって表されるScoSHC P1バリエーション(W196G突然変異)

【0755】

反応物(0.5ml体積)は、2.36g/lホモファルネソール、SHC酵素を産生しているOD_{650nm}が6までの細胞を含有しており、脱イオン水中30℃にて行った(一定の攪拌)。それらを24h後に溶媒抽出し、反応産物中のそれらの含量(表13に示されるとおり)とE,E-およびE,Z-ホモファルネソール異性体とをGC-FID分析によって分析した。

10

【0756】

結果は、P1突然変異が、試験された野生型SHC酵素中へ挿入されたときに、ホモファルネソールの総変換の増大を指し示した(図11)。

【0757】

適用された反応条件では、野生型SHC酵素の、E,E-ホモファルネソールに対する選択性が、既に相当高かった。それにもかかわらず、対応するP1バリエーションの、E,E-ホモファルネソールに対する選択性が増大したと結論付けることは可能であって、この選択性の増大は、TelSHC P1でより顕著であり、対応する野生型酵素との比較においてScoSHC P1に関しても有意であった(図11)。

20

【0758】

例14

下の表は、以前描かれた表10と同一である。この表は、5つの野生型SHC酵素の活性部位にて保存された一連のアミノ酸を示す。

【0759】

表10.5つのwt SHC酵素の活性部位にて保存された一連のアミノ酸。保存された位置は、5つの異なるWT SHC酵素のアミノ酸位置169、261、312、365、489、600、609、および612に見られ得る。水素結合ポケットにおける相違が、ZmoSHC1、ZmoSHC2、およびScoSHCにおいてアミノ酸位置168のQ、Y、およびCに見られ得る。

30

【表A】

AacSHCとの配列同一性 (%)	0	45.8	38.3	44.2	51.0
AacSHCに基づく活性部位アミノ酸位置	AacSHC	ZmoSHC1	ZmoSHC2	TelSHC	ScoSHC
36	L	V	L	L	L
168	S	Q	Y	S	C
169	W	W	W	W	W
261	I	I	I	I	I
306	A	A	P	P	A
307	S	T	C	C	C
312	W	W	W	W	W
365	F	F	F	F	F
366	Q	E	Q	E	E
420	Y	F	F	F	F
489	W	W	W	W	W
600	G	G	G	G	G
607	L	L	L	L	I
609	Y	Y	Y	Y	Y
612	Y	Y	Y	Y	Y

40

保存されたもの(太字フォント)

水素結合ポケットの差異(斜字体フォント)

【0760】

例15

追加のSHCバリエーション(例として、配列番号306、または配列番号5および配列番号369

50

における突然変異の組み合わせ)の基質特異性および産物選択性

P1、P2、またはP3バリエーションの突然変異を、次に導入する:

- 野生型Aac SHCは配列番号1によって表され、次へ繋がる:

○配列番号5および配列番号369によって表されるAac SHC P4バリエーション

○配列番号306によって表されるAac SHC P4バリエーション

【0761】

P4バリエーションの導入は、酵素活性に対して有意な影響を示す。最適化されたものとして定義された反応条件は、EEH生物変換において、低いまたは高い基質濃度のいずれかにて使用される緩衝剤である、0.1Mコハク酸/NaOH緩衝剤において確認/調整(pH)される。全体的に、基質特異性および産物選択性に関する所見は、他の例に記載される結果と合致している。

10

【0762】

例16

SHC#65 P2 SHCで増加されたEEH濃度にて細胞:基質比率を低減させる

使用されたホモファルネソールストックのEE:EZ比率は、80:20であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、例9において概説されるとおりに決定した。

【0763】

反応は、SHCバリエーションのSHC#65 P2を産生している細胞を使用し、Radleys Monoblock Flask(200rpm、一定の攪拌)中25gの総体積(「25ml反応」)で稼働させた。それらは、400g/l E,E-ホモファルネソールと、0.6、0.5、0.4、または0.3の[細胞]:[EEH]比率に適切な量の細胞とを含有していた。反応を、0.025の一定の[SDS]:[細胞]比率にてSDSが提供された0.1Mコハク酸緩衝剤中、pH5.8および35℃にて行った。反応のpHは、外部から校正された電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

20

【0764】

400g/lのEEH濃度で、完全なEEH変換が72時間に[細胞]:[EEH]≥0.5で達成された。0.4の[細胞]:[EEH]比率で、95%EEH変換が同じ時間に得られた。0.3の[細胞]:[EEH]比率にて行われた反応(3日後にはおよそ70%のEEH変換)から、試験された条件下で細胞のグラムあたり少なくとも2.3gのEEHが変換され得ることが推定された。

【0765】

30

例17

増大された容積測定産生能

使用されたホモファルネソールストックのEE:EZ比率は、80:20であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、例9において概説されるとおりに決定した。

【0766】

反応は、SHCバリエーションのSHC#65 P2を産生している細胞を使用し、Radleys Monoblock Flask(200rpm、一定の攪拌)中25gの総体積(「25ml反応」)で稼働させた。それらは、450g/l E,E-ホモファルネソールおよび180g/l細胞(0.4の[細胞]:[EEH]比率)、または250g/l E,E-ホモファルネソールおよび250g/l細胞(1.0の[細胞]:[EEH]比率)のいずれかを含有していた。反応を、0.1Mコハク酸緩衝剤中pH5.8および35℃にて、0.030の一定の[SDS]:[細胞]比率にて行った。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

40

【0767】

450g/l EEHおよび0.4の[細胞]:[EEH]比率で、完全なEEH変換が72hに得られた。完全な変換が24hに、250g/l EEHで、1.0の[細胞]:[EEH]比率にて得られた。これは、適切な量の細胞を使用すると3日間で最大≥450g/l EEHを完全変換する可能性を、および試験された条件下で[細胞]:[EEH]比率が少なくとも0.4と同程度に低い場合にこれが可能であったことを指し示した。

【0768】

例18

50

増加されたEEH濃度での、分取規模の反応:生物変換

使用されたホモファルネソールストックのEE:EZ比率は、80:20であった。使用された細胞懸濁液の細胞濃度は、例9において概説されるとおりに決定した。

【0769】

反応を、水浴中に置かれた1.5リットルスルホン化フラスコ(230rpm、一定の攪拌)中、1.1kgの総体積において行った(「1.1リットル反応」)。反応は、400g/l E,E-ホモファルネソールと、SHCバリエーションSHC#65 P2を産生している200g/l細胞とを含有していた(0.5の[細胞]:[EEH]比率)。反応を、35℃およびpH5.8にて0.1Mコハク酸緩衝液中5g/l SDSの存在下(0.025の[SDS]:[細胞]比率)で行った。反応のpHは、外部から校正されたpH電極にて測定し、必要に応じ適切に希釈されたリン酸により手動で調整した。

10

【0770】

EEH変換は、GC-FID分析結果から判断すると、72時間後 $\geq 97.1\%$ であった。反応ブロスを、500メッシュフィルター上での濾過に先立ち、例としてW02017182542またはW02022023464に記載のとおり処置した。濾過ケーキを脱イオン水で洗浄し、真空下(およそ80mbar、60℃)で乾燥させた。428.6g粗(-)-アンブロックスが回収された(白褐色、わずかに粘着性のある結晶材料)。粗材料のGC-FID分析により、それは、90.7%(-)-アンブロックス、0.0%化合物II、0.0%化合物III、1.2%化合物IV、2.6%E,E-ホモファルネソール、および5.5%E,Z-ホモファルネソールからなっていたことが指し示された。このデータに従うと、(-)-アンブロックスは、反応産物混合物((-)-アンブロックスと、化合物II、III、およびIVとの)の98.7%を占めていた。全体的な(-)-アンブロックス回収率は91.0%であった:期待される427.2gから388.7gが回収された(GC-FIDによって測定されるとおりのEEH変換)。

20

【0771】

追加の配列

>ZmoSHC1 P2:配列番号353

MGIDRMNSLSRLLMKKIFGAEKTSYKPASDTIIGTDTLKRPNRRPEPTAKVDKTIFKT
MGNSLNNTLVSACDWLIGQQKPDGHWVGAVESNASMEA EWCLALWFLGLEDHPLR
PRLGNALLEMQREDGSWGVYFGAGNGDINATVEAYAALRS LGYSADNPVLKKA
AAWIAEKGG LKNIRVFTRYWLALIGEPWEKTPNLPPEIIWFPDNFVFSIYNFAQGARA
TMVPIAILSARRPSRPLRPQDRLDELFP EGRARFDYELPKKEGIDLWSQFFRTTDRGL
HWVQSNLLKRNSLREAAIRHVLEWIIRHQDADGGWGGIQQPPWVYGLMALHGE
GYQLYHPVMAKALSALDDPGWRHDRGESSWIQATNSPVWDTMLALMALKDAKAEDRFT
PEMDKAADWLLARQVKVKGDWSIKLPDVEPGGWAF EYANDRYPDTDDTAVALIAL
SSYRDKEEWQKKGVEDAITRGVNWLIAMQSECGGWGA FDKDNNRSILSKIPFCDFG
ESIDPPSVDVTAHVLEAFGTLGLSRDMPVIQKAIDYVRSEQEAEGAWFGRWGVN
IYGTGAVLPALAAIGEDMTQPYITKACDWLV AHQQEDGGWGESCSSYMEIDSIGK
GPTTPSQTAWALMGLIAANRPEDYEAI AKGCHYLIDRQE QDGSWK EEEFTGT
MFPGYGVGQTIKLDDPALS KRLLQGAELSR AFMLRYDFYRQFFPIMALSRAERLID
LNN

30

【0772】

>ZmoSHC1 P3:配列番号354

MGIDRMNSLSRLLMKKIFGAEKTSYKPASDTIIGTDTLKRPNRRPEPTAKVDKTIFKT
MGNSLNNTLVSACDWLIGQQKPDGHWVGAVESNASMEA EWCLALWFLGLEDHPLR
PRLGNALLEMQREDGSWGVYFGAGNGDINATVEAYAALRS LGYSADNPVLKKA
AAWIAEKGG LKNIRVFTRYWLALIGEPWEKTPNLPPEIIWFPDNFVFSIYNFAQGARA
TMVPIAILSARRPSRPLRPQDRLDELFP EGRARFDYELPKKEGIDLWSQFFRTTDRGL
HWVQSNLLKRNSLREAAIRHVLEWIIRHQDADGGWGGIQQPPWVYGLMALHGE
GYQLYHPVMAKALSALDDPGWRHDRGESSWIQVTNSPVWDTMLALMALKDAKAEDRFT
PEMDKAADWLLARQVKVKGDWSIKLPDVEPGGWAF EYANDRYPDTDDTAVALIAL
SSYRDKEEWQKKGVEDAITRGVNWLIAMQSECGGWGA FDKDNNRSILSKIPFCDFG

40

50

ESIDPPSVDTVTAHVLEAFGTLGLSRDMPVIQKAIDYVRSEQEAEAGAWFGRWGVNYIY
GTGAVLPALAAIGEDMTQPYITKACDWLVAHQQEDGGWGESCSSYMEIDSIGKGPT
TPSQTAWALMGLIAANRPEDYEAIAKGCCHYLIDRQEQQDGSWKEEEFTGTMFPGYGV
GQTIKLD DPALSKRLLQGAELSRAFMLRYDFYRQFFPIMALSRAERLIDLNN
【0773】

> ZmoSHC2 P2: 配列番号355

MTVSTSSAFHHSPLSDDVEPIIQKATRALLEKQQQDGHWFVELEADATIPA EYILLK
HYLGEPEDELEIEAKIGRYLRRIQGEHGGWSLFYGGDLDSLATVKAYFALKMIGDSPD
APHMLRARNEILARGGAMRANVFTRIQLALFGAMSWEHVPQMPVELMLMPEWFPV
HINKMAYGARTVLVPLLVLQALKPVARNRGILVDELFPDVLPTLQESGDPIWRRF
FSALDKVLHKVEPYWPKNMRAKAIHSCVHFVTERLNGEDGLGAIYPAIANSVMMYD
ALGYPENHPERAIARRAVEKLMVLDGTEDQGDKEVYCQPCLSPIWDTALVAHAMLE
VGGDEAEKSAISALS WLKPQQILDVKGDWAWRRPDLRPGGWAFQYRNDYYPDVDD
TAVVTMAMDRAAKLSDLHDDFEESKARAMEWTIGMQSDNGGWGAFDANN SYTYL
NNIPFADHGALLDPPTVDVSARCVSMMQAQAGISITDPKMKA AVDYLLKEQEEDGSW
FGRWGVNYIYGTWSALCALNVAALPHDHLAVQKAVAWLKTIQNEDGGWGENCDSY
ALDYSGYEPM DSTASQTAWALLGLMAVGEANSEAVTKGINWLAQNQDEEGLWKED
YYSGGMFPRVFYLR YHGYSKYFPLWALARYRNLKKANQPIVHYGM
【0774】

> ZmoSHC2 P3: 配列番号356

MTVSTSSAFHHSPLSDDVEPIIQKATRALLEKQQQDGHWFVELEADATIPA EYILLK
HYLGEPEDELEIEAKIGRYLRRIQGEHGGWSLFYGGDLDSLATVKAYFALKMIGDSPD
APHMLRARNEILARGGAMRANVFTRIQLALFGAMSWEHVPQMPVELMLMPEWFPV
HINKMAYGARTVLVPLLVLQALKPVARNRGILVDELFPDVLPTLQESGDPIWRRF
FSALDKVLHKVEPYWPKNMRAKAIHSCVHFVTERLNGEDGLGAIYPAIANSVMMYD
ALGYPENHPERAIARRAVEKLMVLDGTEDQGDKEVYCQVCLSPIWDTALVAHAMLE
VGGDEAEKSAISALS WLKPQQILDVKGDWAWRRPDLRPGGWAFQYRNDYYPDVDD
TAVVTMAMDRAAKLSDLHDDFEESKARAMEWTIGMQSDNGGWGAFDANN SYTYL
NNIPFADHGALLDPPTVDVSARCVSMMQAQAGISITDPKMKA AVDYLLKEQEEDGSW
FGRWGVNYIYGTWSALCALNVAALPHDHLAVQKAVAWLKTIQNEDGGWGENCDSY
ALDYSGYEPM DSTASQTAWALLGLMAVGEANSEAVTKGINWLAQNQDEEGLWKED
YYSGGMFPRVFYLR YHGYSKYFPLWALARYRNLKKANQPIVHYGM
【0775】

> TelSHC P2: 配列番号359

MPTSLATAIDPKQLQQAIRASQDFLFSQQYAEGYWWAELESNVTMTAEVILLH KIW
GTEQRLPLAKAEQYLRNHQRDHGGWELFYGDGGDLSTSVEAYMGLRLLGVPETDPA
LVKARQFILARGGISKTRIFTKLHLALIGCYDWRGIPSLPPWIMLLPEGSPFTIYEMSS
GARSSTVPLLIVMDRKPVYGM DPITLDELYSEGRANV VWELPRQGDWRDVFGLD
RVFKLFETLNIHPLREQGLKAAEEWVLERQEASGDWGGIIPAMLNSLLALRALDYAV
DDPIVQRGMAAVDRFAIETET EYRVQPCVSPVWDTALVMRAMVD SGVAPDHPALV
KAGEWLLSKQILDYGDWHIKNKKGRPGGWAFEFENRFYPDVDDTAVVVMALHAVT
LPNENLKRRAIERAVAWIASMQCRPGGWAAFDVDNDQD WLNIGIPYGDLKAMIDPN
TADV TARVLEMVGRCQLAFDRVALDRALAYLRNEQEPEGCWFGRWGVNYLYGTSG
VLTALSLVAPRYDRWRIRRAAEWLMQCQNADGGWGETCWSYHDP SLKGKGDSTAS
QTAWAIIIGLLAAGDATGDYATEAIERGIA YLLETQRPDGTWHEDYFTGTMFCHFYL
KYHYYQQHFPLTALGRYARWRNLLAT
【0776】

> TelSHC P3: 配列番号360

MPTSLATAIDPKQLQQAIRASQDFLFSQQYAEGYWWAELESNVTMTAEVILLH KIW
GTEQRLPLAKAEQYLRNHQRDHGGWELFYGDGGDLSTSVEAYMGLRLLGVPETDPA

10

20

30

40

50

LVKARQFILARGGISKTRIFTKLHLALIGCYDWRGIPSLPPWIMLLPEGSPFTIYEMSS
GARSSTVPLLIVMDRKPVYGMPPITLDELYSEGRANVWELPRQGDWRDVFGLD
RVFKLFETLNIHPLREQGLKAAEEWVLERQEASGDWGGIIPAMLNSLLALRALDYAV
DDPIVQRGMAAVDRFAIETETERYVQVCVSPVWDTALVMRAMVDSGVAPDHPALV
KAGEWLLSKQILDYGDWHIKNKKGRPGGWAFEFENRFYPDVDDTAVVVMALHAVT
LPNENLKRRRAIERAVAWIASMQCRPGGWAAFDVDNDQDWLNGIPYGD LKAMIDPN
TADV TARVLEMVGRCQLAFDRVALDRALAYLRNEQEPEGCWFGRWGVNYLYGTSG
VLTALSLVAPRYDRWRIRRAAEWLMQCQNADGGWGETCWSYHDP SLKGKGDSTAS
QTAWAIIGLLAAGDATGDYATEAIERGIAYLLETQRPDGTWHEDYFTGT MFPCHFYL
KYHYYQQHFPLTALGRYARWRNLLAT

10

【0777】

> ScoSHC P2: 配列番号 357

MTATTDGSTGASLRPLAASASDITIPAAAAGVPEAAARATRRATDFLLAKQDAEG
WWKGDLETNVTMDAEDLLLRQFLGIQDEETTRAAALFIRGEQREDGTWATFYGGPG
ELSTTIEAYVALRLAGDSPEAPHMARA AEWIRSRGGIASARVFTRIWLALFGWWKW
DDLPELPPELIYFPTWVPLNIYDFGCGARQTIVPLTIVSAKRPVRPAPFPLDELHTDP
ARNP PRPLAPVASWDGAFQRIDKALHAYRKVAPRR LRRAAMNSAARWIIERQEND
GCWGGIQPPAVYSVIALYLLGYDLEHPVMRAGLES LDRFAVWREDGARMIEACQSP
VWDTCLATIALADAGVPEDHPQLVKASDWM LGEQIVRPGDWSVKRPGLPPGGWAF
EFHNDNYPDIDDTAEVVLALRRVRHHDPERVEKAIGRGVRWN LGMQSKNGAWGAF
DVDNTSAFPNRLPFCDFGEVIDPPSADVT AHVVEMLAVEGLAHDPRTRRGIQWLLD
AQETDGSWFGRWGVNYVYGTG SVIPALTAAGLPTSHPAIRRAVRWLESVQNE DGG
WGEDLRSYRYVREWSGRGASTASQTGWALMALLAAGERDSKAVERGVAWLAATQR
EDGSWDEPYFTGT MFPWDFSINYNLYRQVFPLTALGRYVHGEPFAKKPRAADAPAE
AAPAEVKGS

20

【0778】

> ScoSHC P3: 配列番号 358

MTATTDGSTGASLRPLAASASDITIPAAAAGVPEAAARATRRATDFLLAKQDAEG
WWKGDLETNVTMDAEDLLLRQFLGIQDEETTRAAALFIRGEQREDGTWATFYGGPG
ELSTTIEAYVALRLAGDSPEAPHMARA AEWIRSRGGIASARVFTRIWLALFGWWKW
DDLPELPPELIYFPTWVPLNIYDFGCGARQTIVPLTIVSAKRPVRPAPFPLDELHTDP
ARNP PRPLAPVASWDGAFQRIDKALHAYRKVAPRR LRRAAMNSAARWIIERQEND
GCWGGIQPPAVYSVIALYLLGYDLEHPVMRAGLES LDRFAVWREDGARMIEVCQSP
VWDTCLATIALADAGVPEDHPQLVKASDWM LGEQIVRPGDWSVKRPGLPPGGWAF
EFHNDNYPDIDDTAEVVLALRRVRHHDPERVEKAIGRGVRWN LGMQSKNGAWGAF
DVDNTSAFPNRLPFCDFGEVIDPPSADVT AHVVEMLAVEGLAHDPRTRRGIQWLLD
AQETDGSWFGRWGVNYVYGTG SVIPALTAAGLPTSHPAIRRAVRWLESVQNE DGG
WGEDLRSYRYVREWSGRGASTASQTGWALMALLAAGERDSKAVERGVAWLAATQR
EDGSWDEPYFTGT MFPWDFSINYNLYRQVFPLTALGRYVHGEPFAKKPRAADAPAE
AAPAEVKGS

30

【0779】

AacSHC P1バリエーション: 配列番号 4

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWG PLLSNVTMEAEYVLLCHILD RV
DRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQK
ALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMVPPEIMFLGKR MPLNIYEFSGG
ARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGGWIFDALDRALH
GYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPA
FIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDLRVKAGE
WLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVWVALNTLR LPDE
RRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDV

50

TAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLLKREQKPDGSWFGRWGVNYLYGTGAVVSAL
KAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWA
LMALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTGFPDGYLGYTMYRHV
FPTLALGRYKQAIERR

【0780】

AacSHC P2バリエーション: 配列番号5

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSTMEAEYVLLCHILDRV
DRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQK
ALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMVPPEIMFLGKRMPLNIEFGSG
ARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGGWIFDALDRALH
GYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPA
FIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQASISPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGE
WLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRPLPDE
RRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDV
TAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLLKREQKPDGSWFGRWGVNYLYGTGAVVSAL
KAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWA
LMALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTMFPGDGYLGYTMYRH
VFPTLALGRYKQAIERR

【0781】

AacSHC P3バリエーション: 配列番号6

MAEQLVEAPAYARTLDRAVEYLLSCQKDEGYWWGPLLSTMEAEYVLLCHILDRV
DRDRMEKIRRYLLHEQREDGTWALYPGGPPDLDTTIEAYVALKYIGMSRDEEPMQK
ALRFIQSQGGIESSRVFTRMWLALVGEYPWEKVPMVPPEIMFLGKRMPLNIEFGSG
ARATVVALSIVMSRQPVFPLPERARVPELYETDVPPRRRGAKGGGGWIFDALDRALH
GYQKLSVHPFRRAAEIRALDWLLERQAGDGSWGGIQPPWFYALIALKILDMTQHPA
FIKGWEGLELYGVELDYGGWMFQVSISSPVWDTGLAVLALRAAGLPADHDRLVKAGE
WLLDRQITVPGDWAVKRPNLKPGGFAFQFDNVYYPDVDDTAVVVWALNTLRPLPDE
RRRRDAMTKGFRWIVGMQSSNGGWGAYDVDNTSDLPNHIPFCDFGEVTDPPSEDV
TAHVLECFGSFGYDDAWKVIRRAVEYLLKREQKPDGSWFGRWGVNYLYGTGAVVSAL
KAVGIDTREPYIQKALDWVEQHQNPDGGWGEDCRSYEDPAYAGKGASTPSQTAWA
LMALIAGGRAESEAAARRGVQYLVETQRPDGGWDEPYTGTMFPGDGYLGYTMYRH
VFPTLALGRYKQAIERR

【0782】

ZmoSHC1 P1バリエーション: 配列番号312

MTRALRQAPESAGAIGIAAASPATETSGQDTHPREISGAITAARDALLKLQQAADGHW
CFMLEADCTIPAEYILWTHFTGELEPEIERKLAARLRAKQASHGGWPLYEGGDLDIS
CSVKVVYALKLVGDDPNAPHMRRAREAILAQGGGARANVFTRLALAMFSQIPWRGV
PFIPVEIMLLPRWFPFHLSKVSYSWRTVMVPLAILYSLKAQAQNPRNVHIQELFTVP
PEQERHYFPVRSRLNKILLSVERTARLLEPLIPSMRLRRRALKKAETWFTERLNGEDGL
GGIFPAMVNAHESLILLGYSPDHPWRVQAKKALQNLVIEEKNSASCQPCLSPIWDTG
LAALALQETEGGHTTAPVIRALDWLKERQILEQSGDWQVQHPNLKGGGWAFQYNN
SYYPDLDDTALVAWSMDQAATPERYGEAIGRACDWLCGMQSRNGGFAAFESDNTH
YYLNEIPFADHGALLDPPTADVTCIVLLGRLNKPQYAETLQRALDYLRREQEPNG
SWFGRWGTNYIYGTWSALTAEQANIDPQEGFIRKAVEWLKQVQRLDGGWGEDNY
SYFDSSLAGRYQESTPVHTAWALLALMAVGGEANSEAVKKGIAYLLQIQQEDGLWDH
PAFNAPGFPRVFYLYKHGYDKFFPLWALARYRNHLNRQC

【0783】

TeISHC P1バリエーション: 配列番号304

MPTSLATAIDPKQLQQAIRASQDFLFSQQYAEGYWWAELESNVTMTAEVILLHКИW
GTEQRLPLAKAEQYLRNHQRDHGGWELFYGDGGDLSTSVEAYMGLRLLGVPETDPA

LVKARQFILARGGISKTRIFTKLHLALIGCYDWRGIPSLPPWIMLLPEGSPFTIYEMSS
GARSSTVPLLIVMDRKPVYGMPPITLDELYSEGRANVWELPRQGDWRDVFGLD
RVFKLFETLNIHPLREQGLKAAEEWVLERQEASGDWGGIIPAMLNSLLALRALDYAV
DDPIVQRGMAAVDRFAIETETERYVQPCVSPVWDTALVMRAMVDSGVAPDHPALV
KAGEWLLSKQILDYGDWHIKNKKGRPGGWAFEFENRFYPDVDDTAVVVMALHAVT
LPNENLKRRRAIERAVAWIASMQCRPGGWAAFDVDNDQDWLNGIPYGD LKAMIDPN
TADV TARVLEMVGRCQLAFDRVALDRALAYLRNEQEPEGCWFGRWGVNYLYGTSG
VLTALSLVAPRYDRWRIRRAAEWLMQCQNADGGWGETCWSYHDP SLKKGKDSTAS
QTAWAIIGLLAAGDATGDYATEAIERGIAYLLETQRPDGTWHEDYFTGTGFPCHFYL
KYHYYQQHFPLTALGRYARWRNLLAT

10

【0784】

ScoSHC P1バリエーション:配列番号311

MTATTDGSTGASLRPLAASASDITIPAAAAGVPEAAARATRRATDFLLAKQDAEG
WWKGDLETNVTMDAEDLLLRQFLGIQDEETTRAAALFIRGEQREDGTWATFYGGPG
ELSTTIEAYVALRLAGDSPEAPHMARAAEWIRSRGGIASARVFTRIWLALFGWWKW
DDLPELPPELIYFPTWVPLNIYDFGCGARQTIVPLTIVSAKRPVRPAPFPLDELHTDP
ARNPPRPLAPVASWDGAFQRIDKALHAYRKVAPRRLRRAAMNSAARWIIERQEND
GCWGGIQPPAVYSVIALYLLGYDLEHPVMRAGLES LDRFAVWREDGARMIEACQSP
VWDTCLATIALADAGVPEDHPQLVKASDWMLGEQIVRPGDWSVKRPGLP PGGWAF
EFHNDNYPDIDDTAEVVLALRRVRHHDPERVEKAIGRGVRWNLMQSKNGAWGAF
DVDNTSAFPNRLPFCDFGEVIDPPSADVTAHVVEMLAVEGLAHDPRTRRGIQWLLD
AQETDGSWFGRWGVNYVYGTG SVIPALTAAGLPTSHPAIRRAVRWLESVQNE DGG
WGEDLSYRYVREWSGRGASTASQTGWALMALLAAGERDSKAVERGVAWLAATQR
EDGSWDEPYFTGTGFPWDFSINYNLYRQVFPLTALGRYVHGEPFAKKPRAADAPAE
AAPAEVKGS

20

【0785】

ZmoSCH2 P1バリエーション:配列番号313

MTVSTSSAFHHSPLSDDVEPIIQKATRALLEKQQQDGHWFEELEADATIPA EYILLK
HYLGEPEDELEIEAKIGRYLRRIQGEHGGWSLFYGGDLDSLATVKAYFALKMIGDSPD
APHMLRARNEILARGGAMRANVFTRIQLALFGAMSWEHVPQMPVELMLMPEWFPV
HINKMAYGARTVLVPLLVLQALKPVARNRRGILVDELFPDVLPTLQESGDPIWRRF
FSALDKVLHKVEPYWPKNMRAKAIHSCVHFVTERLNGEDGLGAIYPAIANSVMMYD
ALGYPENHPERAIARRAVEKLMVLDGTEDQGDKEVYCQPCLSPIWDTALVAHAMLE
VGGDEAEKSAISALSWLKPQQILDVKGDWAWRRPDLRPGGWAFQYRNDYYPDVDD
TAVVTMAMDRAAKLSDLHDDFEESKARAMEWTIGMQSDNGGWGAFDANN SYTYL
NNIPFADHGALLDPPTVDVSARCVSMMAMAQAGISITDPKMKA AVDYLLKEQEEDGSW
FGRWGVNYIYGTWSALCALNVAALPHDHLAVQKAVAWLKTIQNE DGGWGENCDSY
ALDYSGYEPMDSTASQTAWALLGLMAVG EANSEAVTKGINWLAQNQDEEGLWKED
YYSGGGFPRVFYLYRYHGYSKYFPLWALARYRN LKKANQPIVHYGM

30

【0786】

表18.WO2016/170099およびWO2021/110848の配列ID番号と本開示の新しい配
列ID番号との間の対応を下の表に指し示す。

40

【表 18】

典拠	元の配列番号	新しい配列番号
WO2016/170099	5	361
WO2016/170099	7	362
WO2016/170099	9	363
WO2016/170099	11	364
WO2016/170099	13	365
WO2016/170099	15	366
WO2016/170099	17	367
WO2016/170099	19	368
WO2016/170099	23	369
WO2016/170099	25	370
WO2016/170099	27	371
WO2016/170099	29	372
WO2016/170099	31	373
WO2016/170099	33	374
WO2016/170099	35	375
WO2016/170099	37	376
WO2016/170099	39	377
WO2016/170099	171	378
WO2021/110848	2	379
WO2021/110848	4	380
WO2021/110848	5	381
WO2021/110848	17	382
WO2021/110848	18	383

10

【0787】

表19 すべての配列の概要

20

30

40

50

【表 19 - 1】

アミノ酸 配列番号	突然変異 (単数または複数)	SHC 名称/受入番号/ PCT刊行物
配列番号 1	なし	AacSHC
配列番号 2	M132R + A224V + I432T + A557T + R613S	SHC65
配列番号 3	M132R + A224V + I432T	215G2
配列番号 4	W169G	AacSHC P1
配列番号 5	W169G + G600M	AacSHCP2
配列番号 6	W169G + G600M + A306V	AacSHCP3
配列番号 7	M132R + A224V + I432T + A557T + R613S + W169G	SHC65P1
配列番号 8	M132R + A224V + I432T + A557T + R613S + W169G + G600M	SHC65P2
配列番号 9	M132R + A224V + I432T + A557T + R613S + W169G + G600M + A306V	SHC65P3
配列番号 10	M132R + A224V + I432T + W169G	215G2SHCP1
配列番号 11	M132R + A224V + I432T + W169G + G600M	215G2SHCP2
配列番号 12	M132R + A224V + I432T + W169G + G600M + A306V	215G2SHCP3
配列番号 13	<i>Zymomonas mobilis subsp. mobilis</i> ZM4 ATCC 31821	AAV90172.1
配列番号 14	<i>Zymomonas mobilis</i> (ZmoSHC1) ATCC31821 PF62207_2 Genpept 受託番号 AAV90172 AAF12829.1 AVZ42714.1	WO2010139719 US20120135477
配列番号 15	ZmoSHC2 EMBL/Genbank 受託番号 X80766	WO2010139719 US20120135477
配列番号 16	<i>Bradyrhizobium japonicum</i> (BjpSHC) PF62207_5 ABQ33590.	WO2010139719 US20120135477
配列番号 17	<i>Burkholderia ambifaria</i>	WO2010139719 US20120135477
配列番号 18	<i>Burkholderia ambifaria</i>	WO2010139719 US20120135477
配列番号 19	<i>Bacillus anthracis</i>	WO2010139719 US20120135477
配列番号 20	<i>Frankia alni</i>	WO2010139719 US20120135477
配列番号 21	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	WO2010139719 US20120135477
配列番号 22	<i>Gluconobacter morbifer</i> (WT GmoSHC)	WO2018157021 EHH69691.1
配列番号 23	<i>Thermosynechococcus elongatus</i> (TeSHC)	BAC09861.1
配列番号 24	<i>Acetobacter pasteurianus</i> (ApaSHC1)	ASC07046.1
配列番号 25	<i>Bacillus megaterium</i> (BmeSHC)	WP_016763969

【0788】

10

20

30

40

50

【表 19 - 2】

配列番号 26	<i>Streptomyces albolongus</i> SalSHC)	AZN28579
配列番号 27	<i>Acetobacter pasteurianus</i> ApaSHCA)	WP_003625617
配列番号 28	<i>Burkholderia ambifaria</i> BamSHC1)	AJY25620.1
配列番号 29	<i>Burkholderia ambifaria</i> (BamSHC2)	ABI91648.1
配列番号 30	<i>Pelobacter carbinolicus</i> (PcaSHC2) または <i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380	ABA87615.1
配列番号 31	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> (RpaSHC1)	ABJ08391.1
配列番号 32	<i>Streptomyces coelicolor</i> (ScoSHC)	CAB39697.1
配列番号 33	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i> (SfuSHC)	ABK17672.1
配列番号 34	<i>Teredinibacter turnerae</i> (TtuSHC)	ACR13362.1
配列番号 35	配列番号35は、野生型AacSHCを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 36	配列番号36は、配列番号2 (SHC#65バリエーション)のポリペプチドを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 37	配列番号37は、215G2バリエーション (配列番号3)をコードする ヌクレオチド配列である。	
配列番号 38	配列番号38は、配列番号4によって 表されるAacSHC P1をコードする ヌクレオチド配列である。	
配列番号 39	配列番号39は、配列番号5によって 表されるAacSHC P2をコードする ヌクレオチド配列である。	
配列番号 40	配列番号40は、配列番号6によって 表されるAacSHC P3をコードする ヌクレオチド配列である。	
配列番号 41	配列番号41は、配列番号7によって 表されるSHC#65 P1バリエーションを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 42	配列番号42は、配列番号8によって 表されるSHC#65 P2バリエーションを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 43	配列番号43は、配列番号9によって 表されるSHC#65 P3バリエーションを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 44	配列番号44は、配列番号10によって 表される215G2 P1バリエーションを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 45	配列番号45は、配列番号11によって 表される215G2 P2バリエーションを コードするヌクレオチド配列である。	
配列番号 46	配列番号46は、配列番号12によって 表される215G2 P3バリエーションを コードするヌクレオチド配列である。	

10

20

30

【0789】

40

50

【表 19 - 3】

配列番号 47	M132R + A224V + I432T + Y81H+ A557T + R613S	SHC66
配列番号 48	M132R + A224V + I432T + Y81H+ H431L+ A557T	SHC110B8
配列番号 49	M132R + A224V + I432T + T90A + R613S	SHC90C7
配列番号 50	M132R + A224V + I432T +A172T + M277K	SHC115A7
配列番号 51	M132R + A224V + I432T +L37Q	
配列番号 52	M132R + A224V + I432T +V174I	
配列番号 53	M132R + A224V + I432T +V174I + F601Y	
配列番号 54	M132R + A224V + I432T + L37Q +V174I + F601Y	
配列番号 55	Acetobacter pasteurianus IFO 3283- 01 BAH99456.1 スクアレンホペンシクラーゼ [Acetobacter pasteurianus IFO3283-01]	
配列番号 56	<i>Acidithiobacillus caldus</i>	EET25937.1
配列番号 57	<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	ACH84004.1
配列番号 58	<i>Acidothermus cellulosilyticus</i>	ABK53469.1
配列番号 59	<i>Adiantum capillus-veneris</i>	BAF93209.1
配列番号 60	<i>Histoplasma capsulatum</i> H143	EER40510.1
配列番号 61	<i>Histoplasma capsulatum</i> G186AR	EEH02950.1
配列番号 62	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> LAA1	EED08231.1
配列番号 63	スクアレンホペンシクラーゼ - 部分的 [<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>]	
配列番号 64	<i>Alicyclobacillus acidoterrestris</i>	CAA61950.1
配列番号 65	<i>Anabaena variabilis</i>	ABA24268.1
配列番号 66	<i>Anaeromyxobacter</i> sp.	ABS28257.1
配列番号 67	<i>Aspergillus clavatus</i>	EAW07713.1
配列番号 68	<i>Aspergillus flavus</i>	EED48353.1
配列番号 69	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EDP50814.1
配列番号 70	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EAL84865.1
配列番号 71	<i>Aspergillus fumigatus</i>	EAL86291.2
配列番号 72	<i>Aspergillus niger</i>	CAK43501.1
配列番号 73	<i>Aspergillus niger</i>	
配列番号 74	<i>Aspergillus oryzae</i>	BAE63941.1
配列番号 75	<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	ABS74269.1
配列番号 76	<i>Bacillus wiedmannii</i>	EEK66523.1
配列番号 77	<i>Bacillus cereus</i> G9241	EAL12758.1
配列番号 78	<i>Bacillus cereus</i> Rock3-42	EEL44583.1
配列番号 79	<i>Bacillus cereus</i> m1293	EEK43841.1
配列番号 80	<i>Bacillus cereus</i>	EEK82938.1
配列番号 81	<i>Bacillus cereus</i>	EEK99528.1
配列番号 82	<i>Bacillus cereus</i>	EEK77935.1
配列番号 83	<i>Bacillus cereus</i>	EEL81079.1
配列番号 84	<i>Bacillus cereus</i> m1550	EEK88307.1
配列番号 85	<i>Bacillus cereus</i> F65185	EEL63943.1
配列番号 86	<i>Bacillus cereus</i> Rock4-18	EEL59884.1
配列番号 87 モリブドブデリン 産生因子、サブユニット I [<i>Bacillus cereus</i> Rock4-18] EEL59884.2 配列番号 88	<i>Bacillus cereus</i>	EEL69857.1

【 0 7 9 0 】

【表 19 - 4】

配列番号 89	<i>Bacillus cereus</i> AH1273	EEL92663.1
配列番号 90	<i>Bacillus cereus</i> Rock3-44	EEL49968.1
配列番号 91	<i>Bacillus cereus</i> E33L	AAU16998.1
配列番号 92	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 10987	AAS42477.1
配列番号 93	<i>Bacillus cereus</i> G9842	ACK95843.1
配列番号 94	<i>Bacillus coahuilensis</i>	ZP_03226483.1
配列番号 95	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	ABS22481.1
配列番号 96	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13	AAU23777.1
配列番号 97	<i>Bacillus mycoides</i> DSM 2048	EEL98438.1
配列番号 98	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	EEM04821.1
配列番号 99	<i>Bacillus pseudomycoides</i> DSM 12442	EEM16144.1
配列番号 100	<i>Bacillus pumilus</i> SAFR-032	ABV62529.1
配列番号 101	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061	EDW21137.1
102	<i>Bacillus</i> sp. NRRL B-14911	EAR64404.1
103	<i>Bacillus</i> sp. SG-1	EDL66148.1
104	<i>Bacillus subtilis</i>	Q796C3.1
105	<i>Bacillus subtilis</i>	AAB84441.1
106	<i>Bacillus thuringiensis</i> str. Al Hakam	ABK86448.1
107	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>tochigiensis</i> BGSC 4Y1	EEM21409.1
108	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>huazhongensis</i> BGSC 4BD1	EEM82653.1
109	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i> str. T03a001	EEM52372.1
110	<i>Bacillus thuringiensis</i> Bt407	EEM27851.1
111	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>sotto</i> str. T04001	EEM40716.1
112	<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>pakistani</i> str. T13001	EEM46814.1
113	<i>Bacillus thuringiensis</i> IBL 200	EEM94969.1
114	<i>Bacillus mycoides</i> KBAB4	ABY44436.1
115	<i>Pedospaera parvula</i> Ellin514	EEF59508.1
116	<i>Beijerinckia indica</i> subsp. <i>indica</i> ATCC 9039	ACB96717.1
117	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	EAQ81955.1
118	<i>Blastopirellula marina</i> DSM 3645	EAQ78122.1
119	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	CAA60250.1
120	<i>Acetobacter pasteurianus</i> IFO 3283- 01	BAH98349.1
121	<i>Bradyrhizobium</i> sp. ORS 278	CAL79893.1
122	<i>Brevibacillus brevis</i> NBRC 100599	BAH44778.1
123	<i>Burkholderia ambifaria</i> IOP40-10	EDT05097.1
124	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	EDT37649.1
125	<i>Burkholderia ambifaria</i> MC40-6	ACB68303.1
126	<i>Burkholderia ambifaria</i> MEX-5	EDT42454.1
127	<i>Burkholderia cenocepacia</i> PC184	EAY66961.1
128	<i>Burkholderia cenocepacia</i>	ACA95661.1
129	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	CAR57099.1
130	<i>Burkholderia cenocepacia</i> J2315	CAR56694.1

【0791】

10

20

30

40

50

【表 19 - 5】

131	<i>Burkholderia dolosa</i> AU0158	EAY71311.1
132	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	ACR32572.1
133	<i>Burkholderia glumae</i> BGR1	ACR30752.1
134	<i>Burkholderia graminis</i> C4D1M	EDT12320.1
135	<i>Burkholderia mallei</i> SAVP1	ABM48844.1
136	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	ABX19650.1
137	<i>Burkholderia multivorans</i> ATCC 17616	ABX16859.1
138	<i>Burkholderia phymatum</i>	ACC73258.1
139	<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN	ACD21317.1
140	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	EEC32728.1
141	<i>Burkholderia</i> sp. H160	EEA03553.1
142	<i>Burkholderia lata</i>	ABB06563.1
143	<i>Burkholderia lata</i>	ABB10136.1
144	<i>Burkholderia</i> sp. CCGE1002	EFA54357.1
145	<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	ABE35912.1
146	<i>Candidatus Koribacter versatilis</i> Ellin345	ABF40741.1
147	<i>Candidatus Kuenenia stuttgartiensis</i>	CAJ71215.1
148	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076	ABJ82180.1
149	<i>Candidatus Solibacter usitatus</i> Ellin6076	ABJ82254.1
150	<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928	ACU75510.1
151	<i>Chthoniobacter flavus</i> Ellin428	EDY15838.1
152	<i>Chthoniobacter flavus</i> Ellin428	EDY22035.1
153	<i>Crocospaera watsonii</i> WH 8501	EAM53094.1
154	<i>Cupriavidus taiwanensis</i> LMG 19424	CAQ72562.1
155	<i>Crocospaera subtropica</i> ATCC 51142	ACB53858.1
156	<i>Gloeotheca citriformis</i> PCC 7424	ACK71719.1
157	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 8802	EDY02410.1
158	<i>Rippakea orientalis</i> PCC 8801	ACK66841.1
159	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7822	EDX97382.1
160	<i>Crocospaera chwakensis</i>	EAZ91809.1
161	<i>Cyanothece</i> sp. PCC 7425	ACL45896.1
162	<i>Rippakea orientalis</i> PCC 8802	ACV02092.1
163	<i>Desulfovibrio salexigens</i> DSM 2638	EEC62384.1
164	<i>Dryopteris crassirhizoma</i>	BAG68223.1
165	<i>Frankia alni</i> ACN14a	CAJ61140.1
166	<i>Frankia alni</i> ACN14a	CAJ60090.1
167	<i>Frankia casuarinae</i>	ABD10207.1
168	<i>Frankia</i> sp.	ABW15063.1
169	<i>Frankia</i> sp.	ABW14125.1
170	<i>Frankia</i> sp. Eul1c	EFA59873.1
171	<i>Frankia</i> sp. Eul1c	EFA59089.1
172	<i>Geobacillus</i> sp.	EED61885.1
173	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	EDY05760.1
174	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC52	EEN95021.1
175	<i>Geobacillus</i> sp. Y412MC61	ACX79399.1
176	<i>Geobacter bemidjensis</i>	ACH40355.1
177	<i>Geobacter lovleyi</i>	ACD95949.1
178	<i>Geobacter metallireducens</i>	ABB30662.1

【0792】

10

20

30

40

50

【表 19 - 6】

179	<i>Geobacter metallireducens</i>	ABB33038.1
180	<i>Geotalea daltonii</i> FRC-32	ACM21577.1
181	<i>Geobacter</i> sp. M21	EDV72707.1
182	<i>Geotalea daltonii</i> FRC-32.	ACM22003.1
183	<i>Geobacter</i> sp. M18	EET34621.1
184	<i>Geobacter</i> sp. M21	ACT16952.1
185	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AAR36453.1
186	<i>Geobacter sulfurreducens</i>	AAR34018.1
187	<i>Geotalea uraniireducens</i> Rf4	ABQ25226.1
188	<i>Gloeobacter violaceus</i> PCC 7421	BAC91998.1
189	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	ACI51585.1
190	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	CAP55563.1
191	<i>Gluconobacter oxydans</i>	AAW61994.1
192	<i>Granulibacter bethesdensis</i>	ABI63005.1
193	<i>Hyphomicrobium denitrificans</i> ATCC 51888	EET65847.1
194	<i>Leptospirillum ferro-diazotrophum</i>	EES53667.1
195	<i>Leptospirillum rubrum</i> .	EAY57382
196	<i>Leptospirillum</i> sp.	EDZ38599.1
197	<i>Magnetospirillum magnetotacticum</i>	ZP_00052068.2
198	<i>Methylococcus mobilis</i>	ACD82457.1
199	<i>Methylobacterium extorquens</i> CM4	ACK83067.1
200	<i>Methylobacterium extorquens</i>	ACK86232.1
201	<i>Methylobacterium extorquens</i>	CAX24364.1
202	<i>Methylobacterium nodulans</i>	ACL61886.1
203	<i>Methylobacterium populi</i>	ACB79998.1
204	<i>Methylobacterium radiotolerans</i>	ACB27373.1
205	<i>Methylobacterium</i> sp.	ACA2061.1
206	<i>Methylocella silvestris</i>	ACK52150.1
207	<i>Methylococcus capsulatus</i>	CAA71098.1
208	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181	EAW20752.1
209	<i>Nitrobacter hamburgensis</i>	ABE63461.1
210	<i>Nitrobacter</i> sp.	EAQ34404.1
211	<i>Nitrobacter winogradskyi</i>	ABA05523.1
212	<i>Nitrococcus mobilis</i>	EAR22397.1
213	<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC 19707	ABA57818.1
214	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	ABI59752.1
215	<i>Nitrosomonas</i> sp. AL212	EET32702.1
216	<i>Nitrosospora multiformis</i> ATCC 25196	ABB75845.1
217	<i>Nostoc punctiforme</i> PCC 73102	ACC84529.1
218	<i>Nostoc</i> sp. PCC 7120	BAB72732.1
219	<i>Altipia carboxidovorans</i>	ACI93782.1
220	<i>Paenibacillus</i> sp.	EDS49994.1
221	<i>Paenibacillus</i> sp. JDR-2	ACS99948.1
222	<i>Paenibacillus</i> sp. oral taxon 786	EES74793.1
223	<i>Syntrophotalea carbinolica</i> DSM 2380	ABA87701.1
224	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	ABK98395.1
225	<i>Pelobacter propionicus</i> DSM 2379	ABK98811.1
226	<i>Goniophlebium niponicum</i>	BAI48071.1
227	<i>Goniophlebium niponicum</i>	BAI48070.1
228	<i>Cupriavidus pinatubonensis</i> JMP134	AAZ64302.1

【0793】

【表 19 - 7】

229	<i>Cupriavidus necator</i> H16	CAJ96989.1
230	<i>Ralstonia metallidurans</i>	ABF11015.1
231	<i>Ralstonia metallidurans</i>	ABF11268.1
232	<i>Rhizobium</i> sp.	P55348.1
233	<i>Rhodopirellula baltica</i>	CAD74517.1
234	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ACF02757.1
235	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	CAA71101.1
236	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ABD06434.1
237	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>	ABD87279.1
238	<i>Rhodospirillum rubrum</i> ATCC 11170	ABC20867.1
239	<i>Rubrobacter xylanophilus</i> DSM 9941	ABG05671.1
240	<i>Saccharomonospora viridis</i> DSM 43017	ACU97316.1
241	<i>Saccharopolyspora erythraea</i> NRRL 2338	CAM03596.1
242	<i>Schizosaccharomyces japonicus</i>	EEB08219.1
243	<i>Sphaerobacter thermophilus</i> DSM 20745	ACZ39437.1
244	<i>Streptomyces albus</i>	ZP_04706071.1
245	<i>Streptomyces avermitilis</i> NBRC 14893	BAC69361.1
246	<i>Acaryochloris marina</i>	ABW29816.1
247	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998	ZP_04697579.1
248	<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331	EEW70811.1
249	<i>Streptomyces ghanaensis</i> ATCC 14672	ZP_04684415.1
250	<i>Streptomyces griseoflavus</i>	ZP_05537325.1
251	<i>Streptomyces griseus</i> ATCC 53653	BAG17791.1
252	<i>Streptomyces lividans</i>	ZP_05522220.1
253	<i>Streptomyces peucetius</i> subsp. <i>caesius</i> ATCC 27952	ACA52082.1
254	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486	EDY61772.1
255	<i>Streptomyces scabiei</i>	CBG68454.1
256	<i>Streptomyces</i> sp.	EDX25760.1
257	<i>Streptomyces</i> sp.	EDY46371.1
258	<i>Streptomyces</i> sp. AA4	ZP_05479203.1
259	<i>Streptomyces</i> sp.	ZP_05510126.1
260	<i>Streptomyces</i> sp. Mg1	ZP_05001249.1
261	<i>Streptomyces</i> sp. SPB74	ZP_04995097.1
262	<i>Streptomyces</i> sp. SPB78	ZP_05490781.1
263	<i>Streptomyces svaceus</i> ATCC 29083	EDY55942.1
264	<i>Streptomyces viridochromogenes</i> DSM 40736	ZP_05535608.1
265	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	EDX84551.1
266	<i>Synechococcus</i> sp. PCC 7335	ZP_05035816.1
267	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	BAA17978.1
268	<i>Trichodesmium erythraeum</i>	ABG50159.1
269	<i>Verrucomicrobium spinosum</i> DSM 4136	ZP_02925563.1
270	<i>Acidiphilium cryptum</i>	ABQ30890.1
271	<i>Acetobacter fabarum</i>	PAK78064.1

【0794】

10

20

30

40

50

【表 19 - 8】

272	<i>Acetobacter orleanensis</i> JCM 7639	GAN69910.1
272	<i>Acetobacter orleanensis</i> JCM 7639	GAN69910.1
273	<i>Acetobacter pasteurianus</i>	WP_012812952.1
274	<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	WP_011720532.1
275	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	WP_012811690.1
276	<i>Bacillus megaterium</i>	WP_013083001.1
277	<i>Bacillus subtilis</i>	WP_004399534.1
278	<i>Bacillus thuringiensis</i>	AJ135613.1
279	<i>Brevibacillus thermoruber</i>	WP_029099368.1
280	<i>Chloracidobacterium thermophilum</i>	WP_014100779.1
281	<i>Cohnella thermotolerans</i>	WP_027091823.1
282	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	WP_029761705.1
283	<i>Geobacillus</i> sp.	WP_031409036.1
284	<i>Gluconacetobacter xylinus</i>	CUW48332.1
285	<i>Gluconobacter frateurii</i> NBRC 103465	GAD08844.1
285	<i>Gluconobacter frateurii</i> NBRC 103465	GAD08844.1
286	<i>Komagataeibacter nataicola</i>	AQU88860.1
287	<i>Komagataeibacter xylinus</i>	AHI26287.1
288	<i>Methylobacterium fumariolicum</i>	WP_009061034.1
289	<i>Methylococcus capsulatus</i>	WP_010960137.1
290	<i>Sphaerobacter thermophiles</i>	WP_012872483.1
291	<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>	WP_011698842.1
292	<i>Teredinibacter turnerae</i>	WP_015819476.1
293	<i>Thermoactinomyces</i> sp. Gus2-1	KFZ40906.1
294	<i>Zymomonas mobilis</i>	WP_011241313.1
295	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	P33247.4
配列番号296	<i>WT Pseudomonas mendocina</i> <i>PmeSHC</i> アミノ酸配列	
配列番号297	SHC/HAC 酵素バリエーション #66のヌクレオチド配列	
配列番号298	SHC/HAC 酵素バリエーション #110B8のヌクレオチド配列	
配列番号299	SHC/HACバリエーション #90C7のヌクレオチド配列	
配列番号300	SHC/HACバリエーション #115A7のヌクレオチド配列	
配列番号301	V45L, Q54E, M184I, T326S, F624Y をもつGmoSHCバリエーションの アミノ酸配列	
配列番号302	W172G, F311V, F425Y, G609A をもつTelSHC	
配列番号303	Q221S, W222G, A368V, F486Y, G667AをもつZmoSHC1	
配列番号304	W172GをもつTelSHC	
配列番号305	W169G, G600M, M132R, A224V, およびI432T突然変異をもつAaoSHC	
配列番号306	W169G, G600M, M132R, および I432T突然変異をもつAaoSHC	
配列番号307	EHH69691.1 スクアレン-ホペンシクラーゼ [<i>Gluconobacter moribifer</i> G707]	
配列番号308	EER62728.1 スクアレン-ホペンシクラーゼ [<i>Zymomonas mobilis</i> subsp. <i>mobilis</i> ATCC 10988]	EER62728.1

【0795】

10

20

30

40

50

【表 19 - 9】

配列番号309	AHI26287.1 スクアレノ-ホペンシクラゼ [Komagataeibacter xylinus E25]	AHI26287.1
配列番号310	Geobacillus vulcani WP_031409036.1 MULTISPECIES: スクアレノ-ホペンシクラゼ [Geobacillus]	WP_031409036
配列番号311	W196G突然変異をもつSco SHC	
配列番号312	W222G突然変異をもつZmoSHG1	
配列番号313	W177G突然変異をもつZmoSHG2	
配列番号314	<400> 314 Asp Xaa Asp Asp Thr Ala 1 5 人工配列(モチーフ)	
配列番号315	WT AacSHGにおけるW169G	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号316	W169A	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号317	W169V	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号318	W169G + G600A	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号319	W169G + G600V	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号320	W169G + G600L	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号321	W169G + G600I	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号322	W169G + G600M	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号323	W169A + G600A	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号324	W169A + G600V	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号325	W169A + G600L	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号326	W169A + G600I	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号327	W169A + G600M	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号328	W169V + G600A	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG
配列番号329	W169V + G600V	<i>Alcyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHG

【0796】

10

20

30

40

50

【表 19 - 10】

配列番号 330	W169V + G600L	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 331	W169V + G600I	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 332	W169V + G600M	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 333	W169G + G600A+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 334	W169G + G600V+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 335	W169G + G600L+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 336	W169G + G600I+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 337	W169G + G600M+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 338	W169A+ G600A+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 339	W169A+ G600V+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 340	W169A+ G600L+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 341	W169A+ G600I+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 342	W169A+ G600M+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 343	W169V+ G600A+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 344	W169V+ G600V+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 345	W169V+ G600L+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 346	W169V+ G600I+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 347	W169V+ G600M+A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 348	M132R + A224V + I432T	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHC
配列番号 349	WT AacSHCのヌクレオチド配列 (配列番号1)	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異したSHCをコードするDNA

10

20

30

【0797】

40

50

【表 19 - 11】

配列番号 350	W169G + A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異した SHC
配列番号 351	W169A + A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異した SHC
配列番号 352	W169V + A306V	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i> の突然変異した SHC
配列番号 353	ZmoSHC1 P2	置換 W222G および G667M をもつ 配列番号 13
配列番号 354	ZmoSHC1 P3	置換 W222G、A368V、および G667M をもつ 配列番号 13
配列番号 355	ZmoSHC2 P2	置換 W177G および G619M をもつ 配列番号 15
配列番号 356	ZmoSHC2 P3	置換 W177G、A321V、および G619M をもつ 配列番号 15
配列番号 357	ScoSHC P2	置換 W196G および G629M をもつ 配列番号 32
配列番号 358	ScoSHC P3	置換 W196G、A335V、および G629M をもつ 配列番号 32
配列番号 359	TelSHC P2	置換 W172G および G609M をもつ 配列番号 23
配列番号 360	TelSHC P3	置換 W172G、A311V、および G609M をもつ 配列番号 23
配列番号 361	T77A 合成 <i>AacSHC</i> 誘導体	WO2016/170099 の配列番号 5
配列番号 362	I92V 合成 <i>AacSHC</i> 誘導体	WO2016/170099 の配列番号 7
配列番号 363	F129L	WO2016/170099 の配列番号 9
配列番号 364	M132R	WO2016/170099 の配列番号 11
配列番号 365	A224V	WO2016/170099 の配列番号 13

【0798】

10

20

30

40

50

【表 19 - 12】

配列番号 366	I432T	WO2016/170099 の配列番号15
配列番号 367	Q579H	WO2016/170099 の配列番号17
配列番号 368	F601Y	WO2016/170099 の配列番号19
配列番号 369	M132R + I432T	WO2016/170099 の配列番号23 SHC26
配列番号 370	F601Y	WO2016/170099 の配列番号25 SHC3
配列番号 371	T77A + I92V + F129L	WO2016/170099 の配列番号27 111C8
配列番号 372	Q579H + F601Y	WO2016/170099 の配列番号29 101A10
配列番号 373	F129L	WO2016/170099 の配列番号31 SHC10
配列番号 374	F129L + F601Y	WO2016/170099 の配列番号33 SHC30
配列番号 375	F129L + M132R + I432T	WO2016/170099 の配列番号35 SHC31
配列番号 376	M132R + I432T + F601Y	WO2016/170099 の配列番号37 SHC32
配列番号 377	F129L + M132R + I432T + F601Y	WO2016/170099 の配列番号39 SHC33
配列番号 378	F605W	WO2016/170099 の配列番号171
配列番号 379	M132R, A224V, I432T, A557Tおよび H431L,	SHC#49
配列番号 380	M132R, A224V, I432T, Y81H, A557T および R613S	SHC#66
配列番号 381	M132R, A224V, I432T, Y81H, H431L および A557T	SHC#110B8
配列番号 382	M132R, A224V, I432T, T90A および R613S,	SHC#90C7
配列番号 383	M132R, A224V, I432T, A172T および M277K	SHC#115A7
配列番号 384	<i>Zymomonas mobilis</i> (ZmoSHC1) ATCC31821 PF62207_2 Genpept 受託番号 AAV90172 AAF12829.1 AVZ42714.1	WO2010139719 の配列番号2 US20120135477
配列番号 385	M132R + A224V + I432T + W169G + A306V.	
配列番号 386	M132R + A224V + I432T + A557T + R613S + W169G + A306V.	

10

20

30

40

50

【図面】

【図 1】

図1A

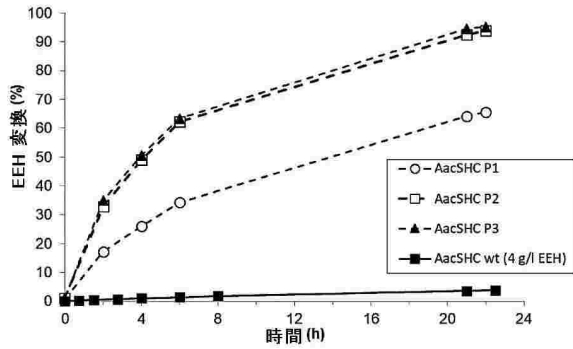
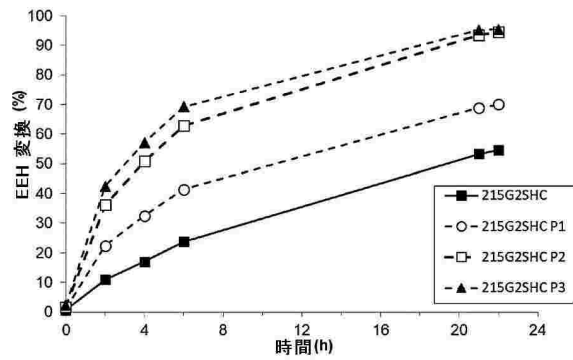
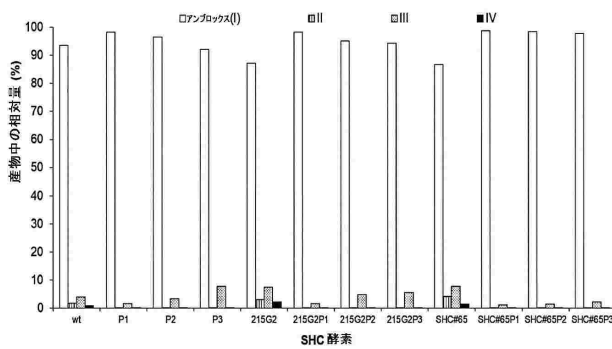


図1B



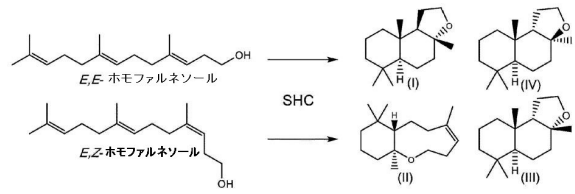
【図 3】

図3



【図 2】

図2

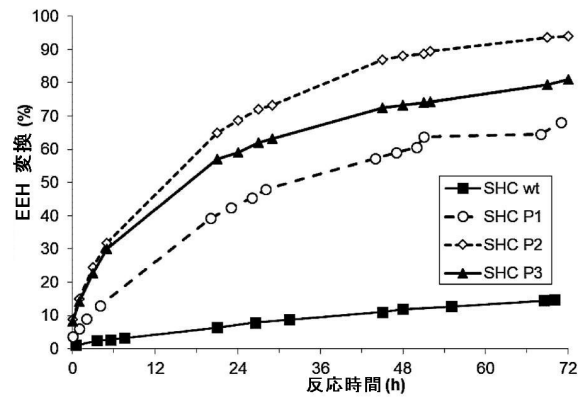


10

20

【図 4】

図4

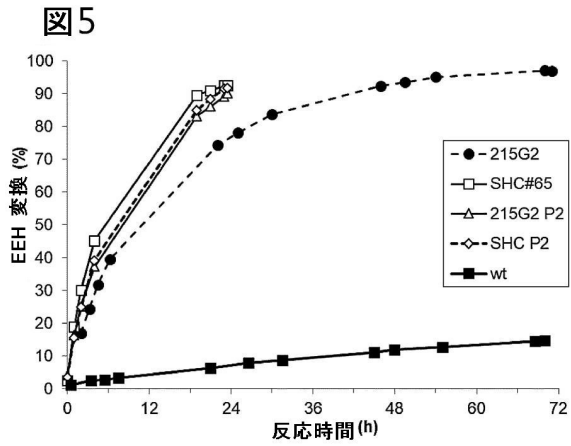


30

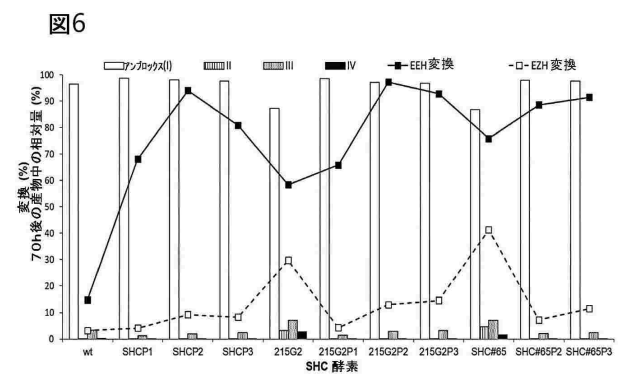
40

50

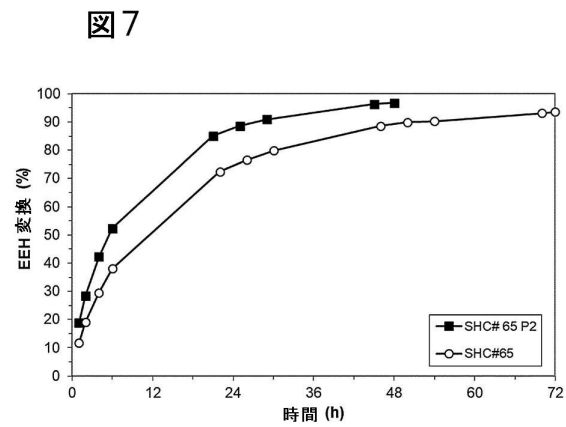
【図 5】



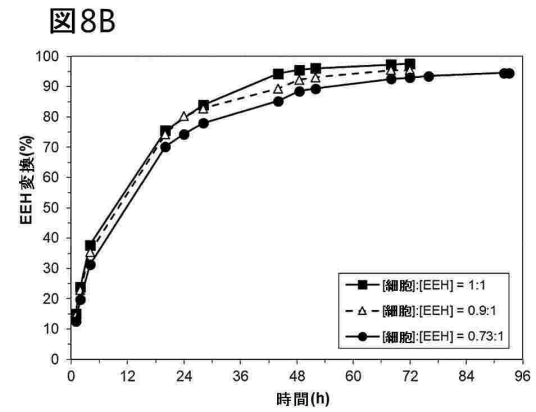
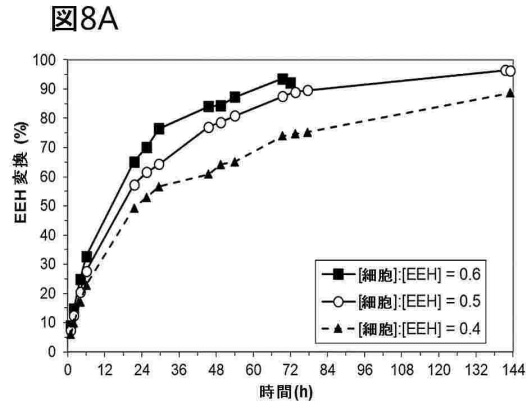
【図 6】



【図 7】



【図 8】



10

20

30

40

50

【図 9 - 1】

図9(1)

	8/13	
BmesHC	-----MILL	5
BamSHC2	-----MIRMMKSGSPBS	13
BmesHC	-----MH-----NQPPF-----RDNLAIVAGSGATSN	24
BamSHC2	-----MNDL-----RNDLISAGSY	16
BmesHC	-----MTVS-----TSSAFHSPLS	15
BjASHC	-----MTVT-----SS-----A-----SARATROPGVY	19
RpaSHC1	-----M-----DS-----I-----LAPRADPRVD	16
GmoSHC	-----MSPADISTASSPOLD	17
ApasHC1	-----MMSAFPSKRLKLSGSDTGTNTVNTLQSGTSDIVRQKAPGEPADLSALKMG	55
ZmoSHC1	MGIDRMSLSRLMKIFGAESYKSPASDITGTDTRKNNRPEFTAVDRTIKFMG	60
TtUSHC	-----MEIQEDVLLSEQLT	17
PcasHC2	-----I-----LQNLGVRRA	14
SfUSHC1	-----MRRLDTPPE-----LPTGSR-----DKPSSGEHSCSTPAFLR	35
TeLSHC	-----MPTSLATAVD	11
AacSHC	-----MAQIUEA	8
ScsSHC	-----MTATDSTGASRLPAA-----SASDITDITPAAGVPE	35

BmesHC	KEVLEIGRIAYLRPTQNGPFCYFCPTGVMPDAFLMLKTRFLOREY-LIKFQTL	64
BamSHC2	SALALAGRDMLALQDQGWGTELSIDATITVAILMMHFKMIDRA-PQPMARY	72
PmesHC	ADLTEAVORATDALLARGLPEGWHYPLESDVATTATHYLAARVLEGAIECEVWYIAGY	84
BamSHC1	AGLDAVASADALLAAGNAGHWYLEADSTIAETVLVHYLGETPBLEQKICRY	76
ZmoSHC2	DDEVEIIGRATRALLEGQDGHVHFVELEADATIPATILIKHYGEPELEAKIRGY	75
BjASHC	TALQTVBAADMLANGQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEDP-LRRLQGR	78
RpaSHC1	GALRESVQAADMLVANGQDGHVGRATNATEMAQCNALMFWLEDR-LRRLQGR	78
GmoSHC	NMLPEAVSSACDMLDQGPDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	76
ApasHC1	NSLHTVSLASCDMLDQGPDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	114
BamSHC1	NSLHTVSLASCDMLDQGPDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	119
TtUSHC	ASASDAVAFLEWLLDQYDGVWALLESNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	76
PcasHC2	KSLDGIESAEWLEAENQDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	73
SfUSHC1	SLSDGIRAVOMVLCQDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	94
TeLSHC	NQIQQAIRADQDGVLPQYAGVWALLESNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	70
AacSHC	PAYATLORAVEVLLSCQDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	67
ScsSHC	EAAARATRAITRLAGQDGHVGPVSNACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	94

BmesHC	IVSLQN-----EDGLATLFDDE-----HNLSATQATYALLSGYQKNDRLKAKERTYIDSGI	121
BamSHC2	LRAIQLDTHGMDLVDG-----PDVSCVRYAFALKAAGSEH-----APMHFRARADALEGGA	130
PmesHC	LRAGCL-----PEGWPLDAGF-----INVSSVYAFALKLADGAD-----APMHFRARADALEGGA	140
BamSHC1	LRAGCL-----PEGWPLDAGF-----INVSSVYAFALKLADGAD-----APMHFRARADALEGGA	140
ZmoSHC2	LRRIQ-----EHGNSLYFGD-----LDLSATVRYAFALKLADGAD-----APMHFRARADALEGGA	131
BjASHC	LLDSQR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	135
RpaSHC1	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	132
GmoSHC	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	133
ApasHC1	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	171
ZmoSHC1	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	176
BamSHC2	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	133
PcasHC2	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	130
SfUSHC1	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	151
TeLSHC	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	126
AacSHC	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	123
ScsSHC	LLDTR-----PDGAMVYFGAGNDINATVYAAALSGLFGD-----EPAVRAREKIEAGGL	150

BmesHC	SRAMELTPMNLVNGVLEHKLTYLLEALLVTVVPEINTELYSTARIBHVPVMAVAG	161
BamSHC2	ARSNVNTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	190
PmesHC	ESSNVFARMLALFLGVPMRALPTMVEVILLAPRWFFFLHAKMASARLVVPLVLSV	200
BamSHC1	EMSNVTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	192
ZmoSHC2	ARSNVNTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	191
BjASHC	NRNVTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	195
RpaSHC1	NRNVTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	192
GmoSHC	NRNVTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	193
ApasHC1	NRNVTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	211
ZmoSHC1	NRNVTELYSTARIBHVPVMAVAG-----FIEVLEFKWVLSMKVYALNTVMVLLVLSL	236

【図 9 - 2】

図9(2)

	9/13	
TtUSHC	KQVUTVPMALIGHGHWETNLPPELIPFVPMVPMYHFAA-----RATVLPCLISAR	193
PcasHC2	KQVUTVPMALIGHGHWETNLPPELIPFVPMVPMYHFAA-----RATVLPCLISAR	190
SfUSHC1	ANINPMVPMALIGHGHWETNLPPELIPFVPMVPMYHFAA-----RATVLPCLISAR	211
TeLSHC	STKATPMLALIGHGHWETNLPPELIPFVPMVPMYHFAA-----RATVLPCLISAR	186
AacSHC	KQVUTVPMALIGHGHWETNLPPELIPFVPMVPMYHFAA-----RATVLPCLISAR	183
ScsSHC	ASARVPMALIGHGHWETNLPPELIPFVPMVPMYHFAA-----RATVLPCLISAR	210

BmesHC	KFLSTRHTPSLSLHVREKQSESETTES-----RASIFL-VDH-LRQASL-----	229
BamSHC2	KARANPMIALPELVPTFPQDQYTP-----PARGMRATLIRVVRHVEPLL-----	242
PcasHC2	KFLSTRHTPSLSLHVREKQSESETTES-----RASIFL-VDH-LRQASL-----	242
BamSHC1	RPIANRPGVYDELVFGVPMNAGLFGQSGWATFRVDMALRAAGLFF-----	247
ZmoSHC2	KFLSTRHTPSLSLHVREKQSESETTES-----RASIFL-VDH-LRQASL-----	242
BjASHC	RPSPLPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	254
RpaSHC1	RPSPLPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	252
GmoSHC	RPSPLPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	250
ApasHC1	RPSPLPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	286
BamSHC1	RPSPLPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	286
TtUSHC	RMVLEKESCLGEFEDRSVAV-----LGKAGAMSTPYHADRALKKVQTFE-----R	248
PcasHC2	RPSPLPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	248
TeLSHC	KPVYQMOPTIDEYSGRANVMLEFRQS-----DNRDPTGLDORVLETETLNI-----	231
AacSHC	QPVYPERARVPEY-----YETDUPPERBARG-----GGGVITADRALMKVQKLS-----	233
ScsSHC	RVPYAPFPELELTPD-----ARINPPLPPLA-----SHDGAFTDRAHAKVAP-----	261

BmesHC	STYIKLGQAMTEHAKIKQGLYSATFTPMYTGALGVKNSFVIGALDGICS	289
BamSHC2	KRLKQALHAGACWAGMAGGGLGGLFPFVYSQVMQVLDGPDHPROCEHAKLE	302
PcasHC2	KRLKQALHAGACWAGMAGGGLGGLFPFVYSQVMQVLDGPDHPROCEHAKLE	315
BamSHC1	NTHERRATVAVPFBESLDAVQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	307
TeLSHC	RPMKAKISCVPTFELHSGDGLGATYATANSVMVLDGPDHPROCEHAKLE	312
BjASHC	GLFPAATSVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	314
RpaSHC1	GLFPAATSVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	312
GmoSHC	GLFPAATSVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	310
ApasHC1	APSRKATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	348
ZmoSHC1	NSLREKATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	353
TtUSHC	QFGRKATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	306
PcasHC2	QFGRKATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	324
SfUSHC1	APFRTATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	326
TeLSHC	APFRTATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	293
AacSHC	APFRTATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	321
ScsSHC	APFRTATVLEMMHMQDGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	321

BmesHC	LLSTC-----SGHVHVNSTVWOTALLSVALQAGVQO-----DPMK	330
BamSHC2	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	357
PcasHC2	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
BamSHC1	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
ZmoSHC2	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
BjASHC	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
RpaSHC1	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
GmoSHC	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
ApasHC1	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
ZmoSHC1	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
TtUSHC	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
PcasHC2	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
SfUSHC1	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
TeLSHC	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
AacSHC	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358
ScsSHC	LLVTR-----PUGSVYDCLSPVWOTATYALPARGVAVPARGASALDELONIA	358

BmesHC	GTVLLEKQHT-----EGDQGHVHVSNAACMAQCNALMFWLEQDHP-LRRLQGR	388
BamSHC2	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
PcasHC2	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
BamSHC1	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
ZmoSHC2	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
BjASHC	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
RpaSHC1	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
GmoSHC	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
ApasHC1	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
ZmoSHC1	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
TtUSHC	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
PcasHC2	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
SfUSHC1	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
TeLSHC	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
AacSHC	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417
ScsSHC	RAYDOLARQVNDLARGNTENAPADQPGGGAQYANPYEYDIDASATVAMRGHRT	417

【図 9 - 3】

図9(3)

	10/13	
RpaSHC1	KAYVRLKQVL-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	414
GmoSHC	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	412
ApasHC1	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	412
ZmoSHC1	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455
TtUSHC	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455
PcasHC2	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455
SfUSHC1	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455
TeLSHC	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455
AacSHC	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455
ScsSHC	KALDMLQVH-----VPGDSYELP-----DVGPGNAFVANNFYEDTDSVALMAAPRHSD	455

BmesHC	T-----DYLESGWGLNLSMOKDQGFAPKNTDILFTLPLENAKADATDATA	442
BamSHC2	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
PmesHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
BamSHC1	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
ZmoSHC2	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
BjASHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
RpaSHC1	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
GmoSHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
ApasHC1	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
ZmoSHC1	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
TtUSHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
PcasHC2	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
SfUSHC1	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
TeLSHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
AacSHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476
ScsSHC	PHAGDSHPFAARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	476

BmesHC	DLYGHWLECGNFAMKMSHPSIEAVALMFDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	502
BamSHC2	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
PmesHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
BamSHC1	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
ZmoSHC2	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
BjASHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
RpaSHC1	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
GmoSHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
ApasHC1	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
ZmoSHC1	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
TtUSHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
PcasHC2	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
SfUSHC1	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
TeLSHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
AacSHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530
ScsSHC	DVSGVLLCFLVYTKR-----ADRSARALAYDILKREPGDQSGNMGVYVITGMAATGLR	530

BmesHC	AVQVASDPRILKALINMLSIQDQDGHGECYSYAE-----KVVY-----ELFSTPSTQAMALG	559
BamSHC2	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
PmesHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
BamSHC1	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
ZmoSHC2	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
BjASHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
RpaSHC1	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
GmoSHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
ApasHC1	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
ZmoSHC1	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
TtUSHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
PcasHC2	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
SfUSHC1	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
TeLSHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
AacSHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584
ScsSHC	LAGDQSGRTIARALDMMGQSGRNGGAFADCDRLNLAIPFAD-----GALLDPTA	584

BmesHC	IMTICPL-----KQDSEKIEKILNPNLZE-----QOTRYTGILP	588
BamSHC2	QMAFGD-----SESVRGILAYQSVQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	635

【図 9 - 4】

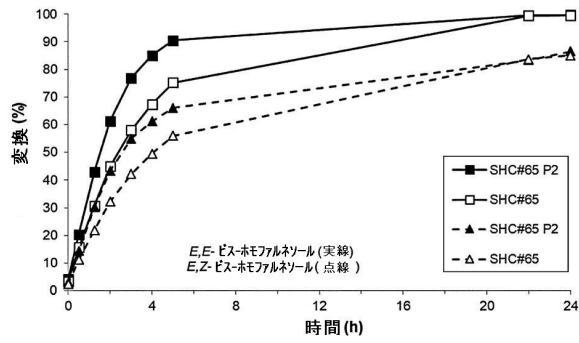
図9(4)

BmesHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
BamSHC2	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
ZmoSHC2	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
BjASHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
RpaSHC1	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
GmoSHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
ApasHC1	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
ZmoSHC1	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
TtUSHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
PcasHC2	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
SfUSHC1	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
TeLSHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
AacSHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629
ScsSHC	IMAGAV-----GHPVSRGADVLATQDQDQSGNMGVYVITGMAATGLR	629

BamSHC	-----QFIQYHSYNDIPFLALAHYAKHSS-----	625
BamSHC2	-----IFLYKHGYTATFFLWALARYRILAGVSAAGAHAPASTGADAA-----LA-----	682
PmesHC	-----VHLYKHGYSEYFFLWALARYRIL-----	653
BamSHC1	-----VFLYKHGYTATFFLWALARYRILKNNRNTATFFGL-----	657
ZmoSHC2	-----VFLYKHGYTATFFLWALARYRILKNNRNTATFFGL-----	657
BjASHC	-----QRLMQPGLSRAPMLRYGYMHHYFFLWALARYRILPQSH-----	684
RpaSHC1	-----QRLMQPGLSRAPMLRYGYMHHYFFLWALARYRILPQSH-----	684
GmoSHC	-----QRLMQPGLSRAPMLRYGYMHHYFFLWALARYRILPQSH-----	684
ApasHC1	-----QRLMQPGLSRAPMLRYGYMHHYFFLWALARYRILPQSH-----	684
ZmoSHC1	-----QRLMQPGLSRAPMLRYGYMHHYFFLWALARYRILPQSH-----	684
TtSHC	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
ApasHC2	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
ZmoSHC2	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
TtSHC	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
PmaSHC1	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
ScuSHC2	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
ScuSHC1	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
AacSHC	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654
ScuSHC	-----KRLQGLAESRAPHMRYDTLRQYFFPMALSRARMHMKEDASAA-----	654

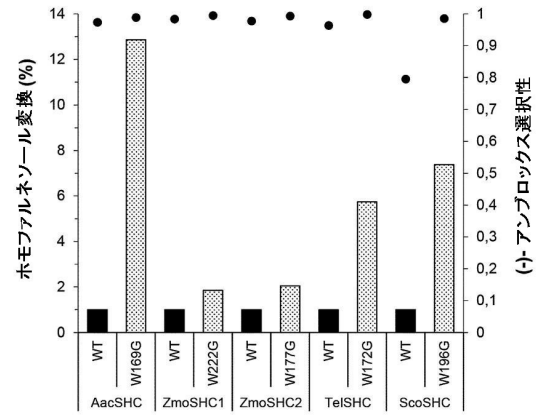
【図 10】

図10



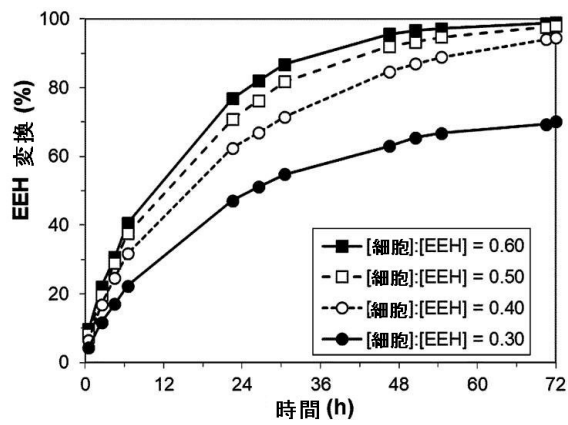
【図 11】

図11



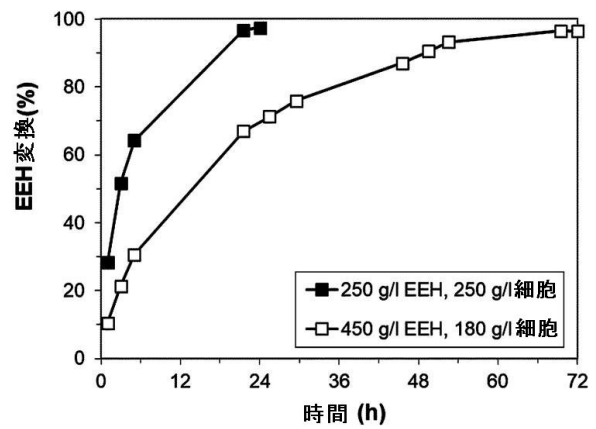
【図 12】

図12



【図 13】

図13



【配列表】

2025509737000001.xml

10

20

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056842

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C12N9/90	A61K8/34	A61Q13/00 C07D307/92 C11D3/50
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N C07D C11D A61Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, COMPENDEX, Sequence Search, EMBASE, FSTA, INSPEC, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018/157021 A1 (INT FLAVORS & FRAGRANCES INC [US]) 30 August 2018 (2018-08-30) cited in the application the whole document [0004], [0005], claims; Example 5, Fig. 1; [0021], Tables 1, 2, [0083], Table 6; [0087], [0093], [0065], [0059], [0068]; -/--	1-6, 34-37, 39, 40, 43-48
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 May 2023		Date of mailing of the international search report 02/08/2023
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Madruga, Jaime

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056842

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	—& DATABASE Geneseq [Online] 18 October 2018 (2018-10-18), "Gluconobacter morbifer mutant squalene hopene cyclase (SHC) #49.", XP002807723, retrieved from EBI accession no. GSP:BFQ23491 Database accession no. BFQ23491 L: Sequence Information; sequence	10
L	—& DATABASE Geneseq [Online] 18 October 2018 (2018-10-18), "Gluconobacter morbifer mutant squalene hopene cyclase (SHC) #48.", XP002807724, retrieved from EBI accession no. GSP:BFQ23490 Database accession no. BFQ23490 L: Sequence Information; sequence	20
L	—& DATABASE Geneseq [Online] 18 October 2018 (2018-10-18), "Gluconobacter morbifer mutant squalene hopene cyclase (SHC) #11.", XP002807725, retrieved from EBI accession no. GSP:BFQ23453 Database accession no. BFQ23453 sequence L: Sequence Information	30
X	----- FUKUDA YORIYUKI ET AL: "Mutated variants of squalene-hopene cyclase: enzymatic syntheses of triterpenes bearing oxygen-bridged monocycles and a new 6,6,6,6,6-fused pentacyclic scaffold, named neogammacerane, from 2,3-oxidosqualene", ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY, vol. 16, no. 37, 6 September 2018 (2018-09-06), pages 8365-8378, XP055970191, ISSN: 1477-0520, DOI: 10.1039/C8OB02009D the whole document page 8376, col. 1, para. 3 ----- -/--	35, 46-48

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056842

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	IDENO NATSUMI ET AL: "Alicyclobacillus acidocaldarius Squalene-Hopene Cyclase: The Critical Role of Steric Bulk at Ala306 and the First Enzymatic Synthesis of Epoxydammarane from 2,3-Oxidosqualene", CHEMBIOCHEM , vol. 19, no. 17 17 June 2018 (2018-06-17), pages 1873-1886, XP055970189, ISSN: 1439-4227, DOI: 10.1002/cbic.201800281 Retrieved from the Internet: URL:https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full-xml/10.1002/cbic.201800281 the whole document table 1, Results	35, 46-48
A	WO 2021/110848 A1 (GIVAUDAN SA [CH]) 10 June 2021 (2021-06-10) cited in the application the whole document SEQ ID NO: 1, Ex. 4, 8, 9, 11, Fig. 4; claims, examples;	1-15, 34-37, 39-48
A	WO 2016/170099 A1 (GIVAUDAN SA [CH]) 27 October 2016 (2016-10-27) cited in the application the whole document claims, examples	1-15, 34-37, 39-48
A	EICHHORN ERIC ET AL: "Alicyclobacillus acidocaldarius Squalene-Hopene Cyclase: The Critical Role of Steric Bulk at Ala306 and the First Enzymatic Synthesis of Epoxydammarane from 2,3-Oxidosqualene", ADVANCED SYNTHESIS AND CATALYSIS , vol. 360, no. 12 2 May 2018 (2018-05-02), pages 2339-2351, XP055777821, ISSN: 1615-4150, DOI: 10.1002/adsc.201800132 Retrieved from the Internet: URL:https://api.wiley.com/onlinelibrary/tdm/v1/articles/10.1002%2Fadsc.201800132 the whole document Table 1	1-15, 34-37, 39-48
1	X,P WO 2022/106522 A1 (UNIV STUTTGART [DE]) 27 May 2022 (2022-05-27) the whole document [0038]-[0046], claims 1-7; [0042], [0058], claims; SEQ ID NO: 2, 6, 7	1-15, 34-37, 39-48
1	-/--	

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2023/056842

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
L	-& DATABASE Geneseq [Online] 23 June 2022 (2022-06-23), "SHC protein mutant G600T/L607A/Y420F/A306V/D436I, SEQ ID 2.", XP002807733, retrieved from EBI accession no. GSP:BKZ34165 Database accession no. BKZ34165 sequence L: Sequence Information -& DATABASE Geneseq [Online] 23 June 2022 (2022-06-23), "A. acidocaldarius SHC protein A306V/Y420F/G600T/L607A, SEQ ID 6.", XP002807734, retrieved from EBI accession no. GSP:BKZ34169 Database accession no. BKZ34169 sequence L: Sequence Information -----	

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2023/056842

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2023/056842**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

10

20

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:
1-15, 34-37, 39-48 (all partially)

30

40

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP2023/056842

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-15, 34-37, 39-48(all partially)

A process for preparing (-)-Ambrox by enzymatically converting (3E,7E)-homofarnesol (EEH) using a SHC/HAC enzyme variant, which has an amino acid sequence having at least 30 % identity or similarity to SEQ ID NO: 1, and amino acid alterations relative to SEQ ID NO: 1 at a position corresponding to W169, A306 and/or G600 of SEQ ID NO: 1, 2, or 3.

A process for preparing Ambra oxide comprising enzymatically converting (2,E)-Bishomofarnesol (BisEEH) using such SHC/HAC enzyme variant.

Such SHC/HAC enzyme variant. Nucleic acid encoding it, construct comprising such nucleic acid sequence, recombinant host cell comprising such nucleic acid or construct.

2-305. claims: 1-48(partially)

As invention 1 but wherein, for each invention, the SHC/HAC enzyme has at least 30% identity or similarity to SEQ ID NO: 2, 3, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382 or 383, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 68, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 307, 308, 309, or 310, respectively.

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2023/056842

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018157021 A1	A1	30-08-2018	BR 112019015747 A2	17-03-2020
			CN 110312796 A	08-10-2019
			EP 3585887 A1	01-01-2020
			JP 2020508651 A	26-03-2020
			US 2020385700 A1	10-12-2020
			WO 2018157021 A1	30-08-2018

WO 2021110848 A1	A1	10-06-2021	BR 112022009627 A2	09-08-2022
			CN 115052982 A	13-09-2022
			CO 2022008659 A2	19-07-2022
			EP 4069836 A1	12-10-2022
			IL 293275 A	01-07-2022
			JP 2023504855 A	07-02-2023
			US 2023021613 A1	26-01-2023
			WO 2021110848 A1	10-06-2021

WO 2016170099 A1	A1	27-10-2016	BR 112017022322 A2	17-07-2018
			CN 107567500 A	09-01-2018
			CN 114438147 A	06-05-2022
			CO 2017010807 A2	20-03-2018
			EP 3286308 A1	28-02-2018
			EP 3760716 A1	06-01-2021
			ES 2838691 T3	02-07-2021
			IL 276291 A	30-09-2020
			IL 286785 A	31-10-2021
			IL 296713 A	01-11-2022
			JP 6616426 B2	04-12-2019
			JP 7213167 B2	26-01-2023
			JP 2018513691 A	31-05-2018
			JP 2020048560 A	02-04-2020
			JP 2023015116 A	31-01-2023
			RU 2017134449 A	24-05-2019
			SG 10202104954X A	29-06-2021
			SG 11201707963Y A	29-11-2017
			US 2018148751 A1	31-05-2018
			US 2020040369 A1	06-02-2020
			US 2021254112 A1	19-08-2021
			US 2023220431 A1	13-07-2023
			WO 2016170099 A1	27-10-2016

WO 2022106522 A1	A1	27-05-2022	NONE	

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 K	8/49 (2006.01)	A 6 1 K	8/49	
A 6 1 Q	13/00 (2006.01)	A 6 1 Q	13/00	1 0 1

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,D
E,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,S
M,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,
AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,
ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,L
A,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,P
H,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,
UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. T R I T O N

2. T W E E N

エルデンーエヒターディンゲン、カールスルーアー シュトラーセ 5 4

F ターム (参考) 4B064 AC21 CA02 CA19 CA21 CC24 DA16 DA19
 4B065 AA01Y AA26X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 AC20 BA01 CA04
 CA27 CA50 CA57
 4C083 AC841 AC842 AD531 AD532 FF01 KK02