

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-502124

(P2007-502124A)

(43) 公表日 平成19年2月8日(2007.2.8)

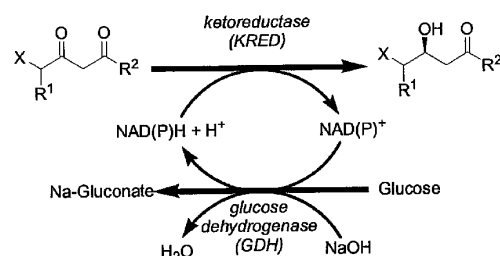
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 9/02 (2006.01)	C 1 2 N 9/02	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2006-523448 (P2006-523448)	(71) 出願人	506038257
(86) (22) 出願日	平成16年8月11日 (2004.8.11)		コデクシス, インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成18年2月2日 (2006.2.2)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 940
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/026655		63, レッドウッド シティ, ペノ
(87) 国際公開番号	W02005/017135		プスコット ドライブ 200
(87) 国際公開日	平成17年2月24日 (2005.2.24)	(74) 代理人	100078282
(31) 優先権主張番号	60/494,195		弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成15年8月11日 (2003.8.11)	(74) 代理人	100062409
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	60/545,682	(74) 代理人	100113413
(32) 優先日	平成16年2月18日 (2004.2.18)		弁理士 森下 夏樹
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(72) 発明者	デービス, エス. クリストファー
			アメリカ合衆国 カリフォルニア 941
			10, サン フランシスコ, ウィンフ
			ィールド ストリート 104
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改良ケトレダクターゼポリペプチドおよび関連ポリヌクレオチド

(57) 【要約】

本発明は、ケトンの立体特異的還元において用いるための、増強されたケトレダクターゼ活性および熱安定性を有する種々のポリペプチドに関する。さらに、本発明は、ケトレダクターゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関し、このポリヌクレオチドは、宿主細胞において増強された発現を提供する、そのポリヌクレオチドのコードを最適化したバージョンを含む。別の局面において、本発明は、ヌクレオチド構築物、ベクターおよび本発明のポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞に関する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

K R E D ポリペプチドであって、該 K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 のポリペプチドの少なくとも 1 . 5 倍の K R E D 活性を有し、かつ、該 K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 相同性である、K R E D ポリペプチド。

【請求項 2】

K R E D ポリペプチドであって、該 K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 のポリペプチドの少なくとも 1 . 5 倍～約 2.5 倍の K R E D 活性を有するが、配列番号 2 の骨格と、A 2 V ; K 3 E ; F 5 L または F 5 C ; N 7 K ; E 9 G または E 9 K ; A 1 2 V ; P 1 3 L ; P 1 4 A ; A 1 6 G または A 1 6 V ; T 1 8 A ; K 1 9 I ; N 2 0 D または N 2 0 S ; E 2 1 K ; S 2 2 N または S 2 2 T ; Q 2 4 H または Q 2 4 R ; V 2 5 A ; N 3 2 S または N 3 2 D ; A 3 6 T ; S 4 1 G ; S 4 2 N ; I 4 5 L ; A 4 8 T ; V 5 6 A ; V 6 0 I ; Y 6 4 H ; N 6 5 K 、 N 6 5 D 、 N 6 5 Y または N 6 5 S ; S 6 6 G または S 6 6 R ; H 6 7 L または H 6 7 Q ; D 6 8 G または D 6 8 N ; G 7 1 D ; E 7 4 K または E 7 4 G ; K 7 8 R ; K 7 9 R ; K 8 5 R ; A 8 6 V ; N 9 0 D ; S 9 3 N または S 9 3 C ; D 9 5 N 、 D 9 5 G 、 D 9 5 V 、 D 9 5 Y または D 9 5 E ; K 9 8 R ; Q 9 9 L 、 Q 9 9 R 、 または Q 9 9 H ; T 1 0 0 A ; I 1 0 1 V ; Q 1 0 3 R ; I 1 0 5 V または I 1 0 5 T ; K 1 0 6 R または K 1 0 6 Q ; H 1 1 0 Y 、 H 1 1 0 C または H 1 1 0 R ; V 1 1 4 A ; A 1 1 6 G ; I 1 2 0 V ; K 1 2 4 R ; D 1 2 9 G または D 1 2 9 N ; D 1 3 1 G または D 1 3 1 V ; D 1 3 2 N ; K 1 3 4 M 、 K 1 3 4 V 、 K 1 3 4 E または K 1 3 4 R ; D 1 3 7 N または D 1 3 7 G ; Q 1 3 8 L ; V 1 4 0 I ; D 1 4 3 N ; L 1 4 4 F ; K 1 4 5 R ; V 1 4 7 A ; V 1 5 0 A ; H 1 5 3 Y または H 1 5 3 Q ; H 1 5 7 Y ; F 1 5 8 L または F 1 5 8 Y ; R 1 5 9 K ; E 1 6 0 G または E 1 6 0 V ; F 1 6 2 Y または F 1 6 2 S ; E 1 6 3 G または E 1 6 3 K ; E 1 6 5 D 、 E 1 6 5 G または E 1 6 5 K ; K 1 6 7 I または K 1 6 7 R ; A 1 7 0 S ; V 1 7 2 I ; F 1 7 3 C ; M 1 7 7 V または M 1 7 7 T ; H 1 8 0 Y ; V 1 8 4 I ; T 1 9 0 A ; A 1 9 3 V ; A 1 9 4 V ; F 2 0 1 L ; K 2 0 3 R ; F 2 0 9 Y ; V 2 1 8 I ; N 2 2 4 S ; E 2 2 6 K 、 E 2 2 6 G または E 2 2 6 D ; S 2 2 8 T ; D 2 2 9 A ; V 2 3 1 I または V 2 3 1 A ; Q 2 2 3 K または Q 2 2 3 R ; E 2 3 4 G または E 2 3 4 D ; T 2 3 5 K または T 2 3 5 A ; N 2 3 7 Y ; K 2 3 8 R または K 2 3 8 E ; T 2 5 1 A ; V 2 5 5 A ; F 2 6 0 L ; A 2 6 2 V ; T 2 7 2 A ; I 2 7 4 L ; I 2 7 5 L または I 2 7 5 V ; および P 2 8 3 R からなる群より選択される 1 ~ 20 個の残基の変化とを有する、K R E D ポリペプチド。

【請求項 3】

K R E D ポリペプチドであって、該 K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 2 4 、配列番号 2 4 4 、配列番号 2 4 6 、配列番号 2 5 0 、配列番号 2 5 2 、配列番号 2 5 4 、配列番号 2 5 6 、配列番号 2 6 0 、配列番号 3 0 4 、配列番号 3 4 4 、配列番号 3 5 4 、配列番号 3 5 8 、配列番号 3 6 0 、配列番号 3 6 4 、配列番号 3 6 8 、配列番号 3 7 4 、配列番号 3 8 2 、配列番号 3 8 6 、配列番号 3 8 8 、配列番号 4 0 0 、配列番号 4 0 8 、配列番号 4 3 8 、配列番号 4 4 0 、配列番号 4 4 8 、配列番号 4 7 0 、配列番号 4 8 4 、配列番号 4 8 6 、配列番号 4 8 8 、配列番号 4 9 0 、配列番号 5 0 2 、配列番号 5 0 6 、配列番号 5 0 8 、配列番号 5 1 2 、配列番号 5 1 4 、配列番号 5 1 6 、配列番号 5 1 8 、配列番号 5 2 0 、配列番号 5 2 2 、配列番号 5 2 4 、配列番号 5 2 6 、配列番号 5 2 8 、配列番号 5 3 0 、配列番号 5 3 2 、配列番号 5 3 4 、配列番号 5 3 6 、配列番号 5 3 8 、配列番号 5 4 0 、および配列番号 5 4 2 からなる群より選択されるアミノ酸を有する、K R E D ポリペプチド。

【請求項 4】

K R E D ポリペプチドであって、該 K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 のポリペプチドの少なくとも 1 . 5 倍～約 2.5 倍のケトレダクターゼ活性を有し、そして、該 K R E D ポリペプチドは、

(a) 配列番号 2 2 4 、配列番号 2 4 4 、配列番号 2 4 6 、配列番号 2 5 0 、配列番号 50

2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 4、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、および配列番号 5 4 2 と少なくとも 9 0 % の相同性を有するアミノ酸配列を有するか；

10

(b) (i) 配列番号 2 2 3、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 5、配列番号 2 5 9、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 3、配列番号 3 5 3、配列番号 3 5 7、配列番号 3 5 9、配列番号 3 6 3、配列番号 3 6 7、配列番号 3 7 3、配列番号 3 8 1、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 7、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0 7、配列番号 4 3 7、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4 7、配列番号 4 6 9、配列番号 4 8 3、配列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、配列番号 5 1 5、配列番号 5 1 7、配列番号 5 1 9、配列番号 5 2 1、配列番号 5 2 3、配列番号 5 2 5、配列番号 5 2 7、配列番号 5 2 9、配列番号 5 3 1、配列番号 5 3 3、配列番号 5 3 5、配列番号 5 3 7、配列番号 5 3 9、または配列番号 5 4 1 のヌクレオチド配列、(i i) 少なくとも 1 0 0 ヌクレオチドの (i) の部分配列、または、(i i i) (i) もしくは (i i) の相補鎖のうちのいずれかと、中程度のストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズする核酸配列によってコードされるか；

20

(c) 1 ~ 6 個のアミノ酸の置換、欠失、および / または挿入を含む、配列番号 2 2 4、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、および配列番号 5 4 2 のポリペプチド改変体であるか；

30

(d) 配列番号 2 2 4、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、および配列番号 5 4 2 のポリペプチドからの少なくとも 2 2 0 アミノ酸残基フラグメントであるか；あるいは、

40

(e) 5 0 にて pH 7 で 6 0 分間インキュベーションした後に、最初の K R E D 活性の 6 0 % より多くを保持する、(a)、(b)、(c) または (d) のポリペプチドであるか；

のいずれかである、K R E D ポリペプチド。

【請求項 5】

50

請求項 1、2、3 または 4 のうちのいずれか 1 項に記載の K R E D ポリペプチドをコードする、ポリヌクレオチド。

【請求項 6】

請求 5 に記載のポリヌクレオチドを含むヌクレオチド構築物であって、遺伝子発現を制御する一つ以上の異種調節配列に対して作動可能に連結されている、ヌクレオチド構築物。

【請求項 7】

請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含むベクターであって、該ポリヌクレオチドは、該ポリヌクレオチドによってコードされる前記 K R E D ポリペプチドの発現の制御配列に対して作動可能に結合されており、該ベクターは、宿主細胞内で該 K R E D ポリペプチドを発現するように該宿主細胞を形質転換し得る、ベクター。

10

【請求項 8】

前記 K R E D ポリペプチドをコードする請求項 5 に記載のポリヌクレオチドを含む宿主細胞であって、該ポリヌクレオチドは、該宿主細胞内で該 K R E D ポリペプチドの発現のための一つ以上の制御配列に対して作動可能に連結されている、宿主細胞。

【請求項 9】

単離されかつ精製された、請求項 1 に記載の K R E D ポリペプチド。

【請求項 10】

凍結乾燥形態の請求項 1 に記載の K R E D ポリペプチド。

【請求項 11】

緩衝化媒体中に請求項 1 に記載の K R E D ポリペプチドを含む、組成物。

20

【請求項 12】

補因子として N A D H を用いることについて増加した特異性を有する請求項 1 に記載の K R E D ポリペプチドであって、配列番号 2 の骨格を有し、E 2 2 6 が変異している、K R E D ポリペプチド。

【請求項 13】

請求項 12 に記載の K R E D ポリペプチドであって、E 2 2 6 が G、D、または K である、K R E D ポリペプチド。

【請求項 14】

増加した熱安定性を有する請求項 1 に記載の K R E D ポリペプチドであって、該 K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 の骨格を有し、P 1 4、V 1 4 0、V 1 8 4 または A 1 9 4 が変異している、K R E D ポリペプチド。

30

【請求項 15】

請求項 12 に記載の K R E D ポリペプチドであって、P 1 4 が A であるか、または V 1 4 0 が I であるか、または V 1 8 4 が I であるか、または A 1 9 4 が V である、K R E D ポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、酵素学の分野、特にケトレダクターゼの酵素学の分野に関する。より正確には、本発明は、増強された酵素活性を有するケトレダクターゼポリペプチド、および、改良ケトレダクターゼポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に関する。

40

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

キラル - 置換 - ヒドロキシ酪酸エステルは、薬の合成において商業的に重要な中間体である。これらの中間体は、H M G - C o A レダクターゼインヒビターの合成において光学活性中間体（例えば、アトルバスタチン、フルバスタチン、およびロスバスタチン）として利用され得る。いくつかの - 置換 - ヒドロキシ酪酸エステルを生成する方法が記載されている。例えば、シアン化ナトリウムとの反応前に保護基によるヒドロキシ基の

50

保護を必要とする 4 - プロモ - 3 - ヒドロキシブチレートから、4 - シアノ - 3 - ヒドロキシ酪酸を生成する方法が報告されている（非特許文献 1）。Isbell ら（非特許文献 2）は、トレオニンの一水和物カルシウム塩と臭化水素とを反応させて、トレオニンのジプロモ形態を生成し、次いでプロモヒドリンに変換することによって、(R) - 4 - シアノ - 3 - ヒドロキシ酪酸エステルを合成する方法をさらに報告している（非特許文献 2）。上記プロモヒドリンのヒドロキシ基は、シアン化ナトリウムで反応させる前に保護される（非特許文献 2）。あいにく、保護する工程および脱保護する工程を必要とする方法は、商業的に提供することが現実的ではない。

【0003】

4 - プロモ - 3 - ヒドロキシ酪酸エチルを利用する最新のシアノヒドリン合成経路が、開発されている。これらの経路は、商業上実施するのに比較的費用がかかる多くの工程を必要とする。

10

【0004】

（ケトレダクターゼの説明）

（KRED の特徴付け）

ケトレダクターゼ（KRED）またはカルボニルレダクターゼクラス（EC 1.1.1.184）に属する酵素は、対応するプロキラルケトン基質から光学活性アルコールを合成するのに有用である。KRED は、代表的には、ケトン基質に対応するアルコール産物に変換するが、KRED はまた、逆反応（アルコール基質に対応するケトン / アルデヒド産物に酸化される反応）を触媒し得る。KRED のような酵素によるケトンの還元およびアルコールの酸化は、補因子（最も一般的には、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸（NADPH）、およびニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）またはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸（NADP））を、酸化反応のために必要とする。NADH および NADPH は、電子ドナーとして働き、他方で、NAD および NADP は、電子受容体として働く。ケトレダクターゼおよびアルコールデヒドロゲナーゼが（その酸化された状態および還元された状態にある）、リン酸化補因子または非リン酸化補因子のいずれかを受け取るが、両方を受け取らないことが、しばしば観察される。

20

【0005】

KRED 酵素は、幅広い細菌および酵母の範囲において見出され得る（非特許文献 3；非特許文献 4；非特許文献 5；Liese を参照のこと）。いくつかの KRED 遺伝子および KRED 酵素の配列が報告されている（例えば、*Candida magnoliae*（Genbank 登録番号 J C 7 3 3 8；GI：11360538）*Candida parapsilosis*（Genbank 登録番号 B A A 2 4 5 2 8 . 1；GI：2815409）、*Sporobolomyces salmonicolor*（Genbank 登録番号 A F 1 6 0 7 9 9；GI：6539734））。

30

【0006】

（所望される KRED の特性）

生細胞における代謝は、デノボ合成および再生により還元反応のための補因子の十分な供給を保证する。したがって、生体触媒によるケトンの還元のために全細胞を使用することは、有利であり得るが、微生物は、代表的には、低い鏡像異性過剰率の少量の産物を導き得る多数のケトレダクターゼを有する。この理由から、Wong らは、半精製したケトレダクターゼ酵素を研究し、そして、より質の高い産物が得られ得ることを見出した（非特許文献 6）。

40

【0007】

インビトロ酵素還元の間、細胞機構が存在しない場合、補因子の再生は、化学量論量のこれらの高価な分子の必要性を回避することが必要とされる。ケトン還元のための酵素の使用は、従って、二つの酵素（KRED および補因子（NADH または NADPH）再生酵素）、例えば、グルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）、ギ酸デヒドロゲナーゼなどを必要とする。酵素は、一般的に、プロセス条件下での酵素の低い活性（例えば、非

50

特許文献 7 ; 非特許文献 8)、不十分な安定性 (非特許文献 9 ; 非特許文献 10)、ならびに基質の阻害または産物の阻害に対する脆弱性 (非特許文献 11 ; 非特許文献 12) に起因して、高価であると考えられる。上述のとおり、補因子は、産業プロセスのためには高価な試薬であり、それらの使用が効果的でなければ、生物学的還元プロセスに多大なコストを加え得る。

【 0 0 0 8 】

これら多くの認識された経済的問題を回避するために、全微生物細胞は、しばしば、生体触媒による還元のための好ましい触媒として考えられている。なぜなら、この全微生物細胞は、代表的には、補因子および補因子再生酵素を含むからである。4 - クロロアセトアセートエステルの不斉還元については、b a k e r 酵母で記載され (非特許文献 13 ; 非特許文献 14)、かつ多くの他の微生物でも記載されている (特許文献 1 ; 特許文献 2 ; および特許文献 3)。しかしながら、微生物細胞を用いる高基質濃度で行われない還元は、効果的ではなく、競合反応に起因する減少した収量の問題があり、そして低い鏡像異性過剰率 (「e . e」) を与える (特許文献 4 ; 特許文献 5 ; 特許文献 6 ; 特許文献 7 ; 特許文献 8 ; および特許文献 9)。

10

【 0 0 0 9 】

K R E D および G D H をコードする遺伝子を E . c o l i のような成長の速い微生物へ導入することは、ケトンの還元についてのより活性な全細胞触媒をもたらした。C a n d i d a m a g n o l i a e 由来のカルボニルレダクターゼ遺伝子および B a c i l l u s m e g a t e r i u m 由来の G D H 遺伝子は、E . c o l i 内でクローン化され、エチル - 4 - クロロ - 3 - ヒドロキシブチレートを生産させた。有意な生産性を達成するために、N A D P 補因子は、触媒に対して十分な活性を提供するために、反応に加えられた。反応の最後には、キラル産物が抽出され、そして、一般的な手法 (例えば、クロマトグラフィーおよび蒸留) によって精製される。この手法は、天然の生物を使用するプロセスについての改善であるが、N A D P が必要な添加物であり続けるような、経済的な生産についての重要な欠点がある。そして、微生物細胞を含む反応混合物から産物を純粋な形態で単離するために、重要なプロセスへの投資が必要とされる。

20

【 0 0 1 0 】

酵素還元プロセスおよび全細胞還元プロセスの両方におけるこれらの記載を考慮すると、本発明の目的は、酵素の産出、それらのアミノ酸配列、ならびに、クリーンな反応プロセスでエチル - 4 - クロロ - 3 - ケトブチレートおよび他のケトンを経済的に還元することを促進するような配列をコードする遺伝子を記載することであった。従って、微生物の還元は、代表的には、5 g / L 以上の細胞濃度を必要とするが、1 g / L を下回る酵素濃度で、好ましくは、0 . 5 g / L を下回る酵素濃度でこれらの反応を触媒する、新しい酵素が記載される。加えて、記載された酵素は、20 時間より短い時間で、少量の補因子しか必要としない、少なくとも 100 g / L の基質の完全変換を触媒する。

30

【 0 0 1 1 】

上記で参照された特許および刊行物、ならびに、本明細書中の至るところで引用された全ての他の特許および刊行物は、本明細書中にその全体が参考として明確に援用される。

【特許文献 1】米国特許第 5 , 5 5 9 , 0 3 0 号明細書

40

【特許文献 2】米国特許第 5 , 7 0 0 , 6 7 0 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 5 , 8 9 1 , 6 8 5 号明細書

【特許文献 4】米国特許第 5 , 4 1 3 , 9 2 1 号明細書

【特許文献 5】米国特許第 5 , 5 5 9 , 0 3 0 号明細書

【特許文献 6】米国特許第 5 , 7 0 0 , 6 7 0 号明細書

【特許文献 7】米国特許第 5 , 8 9 1 , 6 8 5 号明細書

【特許文献 8】米国特許第 6 , 2 1 8 , 1 5 6 号明細書

【特許文献 9】米国特許第 6 , 4 4 8 , 0 5 2 号明細書

【非特許文献 1】A c t a C h e m . S c a n d . , B 3 7 , 3 4 1 (1 9 8 3)

【非特許文献 2】I s b e l l ら、C a r b o h y d r a t e R e s . , 7 2 : 3 0 1

50

(1 9 7 9)

【非特許文献3】KrausおよびWaldman、Enzyme catalysis in organic synthesis、第1巻および第2巻、VCH Weinheim 1995

【非特許文献4】Faber, K., Biotransformation in organic chemistry, 第4版、Springer, Berlin Heidelberg New York. 2000

【非特許文献5】HummelおよびKula、Eur. J. Biochem. 1989 184: 1 - 13

【非特許文献6】Wongら、J. Am. Chem. Soc. 1985 107: 4028 - 4031 10

【非特許文献7】SutherlandおよびWillis、J. Org. Chem. 1998 63: 7764

【非特許文献8】Bustilloら、Tetrahedron Asym. 2002 13: 1681

【非特許文献9】Shimizuら、Appl. Environ. Microbiol. 1990 56: 2374

【非特許文献10】Bradshawら、J. Org. Chem. 1992 57: 1526

【非特許文献11】Kataokaら、Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997 48: 699 20

【非特許文献12】Kitaら、Appl. Environ. Microbiol. 1999 65: 5207

【非特許文献13】Zhou, J. Am. Chem. Soc. 1983 105: 5925 - 5926;

【非特許文献14】Santaniello, J. Chem. Res. (S) 1984: 132 - 133

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0012】

30

(発明の簡単な要旨)

本発明は、種々の局面を有する。一つの局面において、本発明は、配列番号2のKREDと比較して増強されたKRED活性を有するケトレダクターゼ(「KRED」)ポリペプチドに関し、この増強されたKRED活性は、この配列番号2のKRED活性の好ましくは少なくとも1.5倍、代表的には1.5~50倍、より代表的には1.5~約25倍の活性である。このような活性は、NADPHが酸化されて同時にケトンが対応するアルコールに還元されることに起因する、NADPHの吸光度の減少またはNADPHの蛍光の減少から測定される。別の局面において、本発明は、配列番号2のポリペプチドの少なくとも1.5倍、代表的には1.5~50倍、より代表的には1.5~約25倍のKRED活性を有するKREDポリペプチドに関し、このような活性は、NADPHの吸光度またはNADPHの蛍光の減少から測定されるか(例えば、実施例4)、あるいは、結合アッセイにおいて生成された産物から測定される(例えば、実施例5)。このKREDポリペプチドは、配列番号506、配列番号520、配列番号526、配列番号536、および配列番号538のアミノ酸配列と、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、そして、最も好ましくは少なくとも99%相同である。別の局面において、本発明は、配列番号2のKREDと比較して増加したKRED残存活性を有するケトレダクターゼ(「KRED」)ポリペプチドに関し、50 にて15~24時間処理した後、この増加したKRED活性は、配列番号2のKRED活性の少なくとも1.5倍、代表的には1.5~100倍、より代表的には1.5~約60倍である。このような活性は、NADPHが酸化されて同時にケトンが対応するアルコールに還元さ

50

れることに起因する、NADPHの吸光度の減少またはNADPHの蛍光の減少から測定される。なお別の局面において、本発明は、配列番号2のKREDと比較して増加したKRED残存活性を有するKREDポリペプチドに関し、50にて15～24時間処理した後、この増加したKRED活性は、配列番号2のKRED活性の少なくとも1.5倍、代表的には1.5～100倍、より代表的には1.5～約60倍である。このような活性は、NADPHの吸光度の減少またはNADPHの蛍光の減少から測定されるか（例えば、実施例4）、あるいは、結合アッセイにおいて生成された産物から測定される（例えば、実施例5）。このKREDポリペプチドは、配列番号506、配列番号520、および配列番号526のアミノ酸配列と、少なくとも90%相同であり、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、そして、最も好ましくは少なくとも99%相同である。一つの実施形態において、本発明はまた、本明細書中に記載される、単離されかつ精製された形態のKREDポリペプチド改変体に関する。別の実施形態において、上記単離されかつ精製されたKREDポリペプチド改変体は、凍結乾燥形態にある。なお別の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるKREDポリペプチド改変体および適切なキャリア（代表的には緩衝溶液、より代表的には6.0と8.0との間のpHを有する緩衝溶液）を含む組成物に関する。この緩衝化KRED組成物が凍結乾燥形態であることもまた、本発明の範囲内である。

10

【0013】

別の局面において、本発明のKREDポリペプチド改変体は、配列番号2の*Candida magnoliae*のケトレダクターゼについて報告された配列とは、1個～20個のアミノ酸残基、代表的には1個～10個のアミノ酸残基、より代表的には1個～9個のアミノ酸残基、さらにより代表的には1個～8個のアミノ酸残基、最も代表的には1個～7個のアミノ酸残基が異なる。別の局面において、本発明は、KREDポリペプチド（好ましくは、単離されかつ精製された）に関し、このKREDポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドの少なくとも1.5倍、代表的には1.5～50倍、より代表的には1.5～25倍のKRED活性を有し、そして、このKREDポリペプチドは、A2V；K3E；F5LまたはF5C；N7K；E9GまたはE9K；A12V；P13L；P14A；A16GまたはA16V；T18A；K19I；N20DまたはN20S；E21K；S22NまたはS22T；Q24HまたはQ24R；V25A；N32SまたはN32D；A36T；S41G；S42N；I45L；A48T；V56A；V60I；Y64H；N65K、N65D、N65YまたはN65S；S66GまたはS66R；H67LまたはH67Q；D68GまたはD68N；G71D；E74KまたはE74G；K78R；K79R；K85R；A86V；N90D；S93NまたはS93C；D95N、D95G、D95V、D95YまたはD95E；K98R；Q99L、Q99R、またはQ99H；T100A；I101V；Q103R；I105VまたはI105T；K106RまたはK106Q；H110Y、H110CまたはH110R；V114A；A116G；I120V；K124R；D129GまたはD129N；D131GまたはD131V；D132N；K134M、K134V、K134EまたはK134R；D137NまたはD137G；Q138L；V140I；D143N；L144F；K145R；V147A；V150A；H153YまたはH153Q；H157Y；F158LまたはF158Y；R159K；E160GまたはE160V；F162YまたはF162S；E163GまたはE163K；E165D、E165GまたはE165K；K167IまたはK167R；A170S；V172I；F173C；M177VまたはM177T；H180Y；V184I；T190A；A193V；A194V；F201L；K203R；F209Y；V218I；N224S；E226K、E226GまたはE226D；S228T；D229A；V231IまたはV231A；Q223KまたはQ223R；E234GまたはE234D；T235KまたはT235A；N237Y；K238RまたはK238E；T251A；V255A；F260L；A262V；T272A；I274L；I275LまたはI275V；およびP283Rのうちの1～20個の残基の変化、好ましくは1～7個の残基の変化を有する配列番号2のアミノ酸配列を有する。

20

30

40

50

【 0 0 1 4 】

上記実施形態の好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号2のポリペプチドの1.5～約25倍のK R E D活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 1 5 】

【 化 1 】

1.	S42N	配列番号: 224
2.	S42N, K124R, A194V	配列番号: 244
3.	S42N, A194V, K203R	配列番号: 246
4.	S42N, E160G, A194V	配列番号: 250
5.	S42N, D95Y	配列番号: 252
6.	S42N, A194V	配列番号: 254
7.	S42N, V140I, F158L, M177T, V184I	配列番号: 256
8.	H67Q, F158Y, T235K	配列番号: 260
9.	S42N, A194V, T235K	配列番号: 354
10.	E21K, S42N, K78R, A194V	配列番号: 358
11.	S42N, E163K, A194V	配列番号: 360
12.	S42N, V184I, A194V, T235K	配列番号: 364
13.	N7K, S42N, A194V	配列番号: 368
14.	S42N, D129N, A194V	配列番号: 374
15.	E9K, S42N, A194V	配列番号: 382
16.	S42N, D131G, A194V	配列番号: 386
17.	S42N, D131V, A194V	配列番号: 388
18.	S42N, D131G, A194V, T235K	配列番号: 400
19.	S42N, Q103R, A194V	配列番号: 408
20.	E9K, S42N, A194V, K238R	配列番号: 438
21.	S42N, V184I, A194V	配列番号: 440
22.	E9K, S42N, N90D, A194V	配列番号: 448
23.	E9K, S42N, D131G, A194V, Q233R	配列番号: 470
24.	E9K, S42N, D137N, D143N, A194V, K238R	配列番号: 484
25.	E9K, S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 486
26.	E9K, S42N, S66R, A194V, F201L, K238R	配列番号: 488
27.	S42N, A194V, K238 E	配列番号: 490
28.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 498
29.	P14A, S42N, A194V	配列番号: 502
30.	P14A, S42N, T190A, A194V	配列番号: 506
31.	E9K S42N D137N D143N V147A A194V K238R	配列番号: 508
32.	P14A, S42N, V147A, A194V, I275V	配列番号: 512
33.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 514
34.	P14A, S42N, G71D, V147A A194V K238R	配列番号: 516
35.	P14A S42N V147A A194V K238R I275V	配列番号: 518
36.	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	配列番号: 520
37.	P14A S42N T190A A194V	配列番号: 522
38.	P14A S42N V147AA194V I275V	配列番号: 524
39.	P14A S42N V147A A194V K238R	配列番号: 526
40.	N7K P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 528
41.	P14A S42N V147A A194V	配列番号: 530
42.	P14A N32S S42N V147A A194V K238R	配列番号: 532
43.	P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 534
44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538
46.	P14A S42N A194V I275V	配列番号: 540
47.	E9G P14A S42N T190A	配列番号: 542

10

20

30

40

を有することによって配列番号2のポリペプチドとは異なる、K E R Dポリペプチドに関する。

【 0 0 1 6 】

50

本出願において、K R E Dポリペプチドのすべての配列番号には、偶数がつけられ、ポリヌクレオチドのすべての配列番号には、奇数がつけられている。さらに、特定の配列番号（偶数）の各ポリペプチドは、直前の配列番号（奇数）のポリヌクレオチドによってコードされる。従って、配列番号2のK R E Dポリペプチドは、配列番号1のポリヌクレオチドによってコードされる。

【 0 0 1 7 】

さらに好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号2のポリペプチドよりも5～約25倍高いケトレダクターゼ活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 1 8 】

10

【 化 2 】

24.	E9K, S42N, D137N, D143N, A194V, K238R	配列番号: 484
25.	E9K, S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 486
26.	E9K, S42N, S66R, A194V, F201L, K238R	配列番号: 488
27.	S42N, A194V, K238E	配列番号: 490
28.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 498
29.	P14A, S42N, A194V	配列番号: 502
30.	P14A, S42N, T190A, A194V	配列番号: 506
31.	E9K S42N D137N D143N V147A A194V K238R	配列番号: 508
32.	P14A, S42N, V147A, A194V, I275V	配列番号: 512
33.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 514
34.	P14A, S42N, G71D, V147A A194V K238R	配列番号: 516
35.	P14A S42N V147A A194V K238R I275V	配列番号: 518
36.	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	配列番号: 520
37.	P14A S42N T190A A194V	配列番号: 522
38.	P14A S42N V147AA194V I275V	配列番号: 524
39.	P14A S42N V147A A194V K238R	配列番号: 526
40.	N7K P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 528
41.	P14A S42N V147A A194V	配列番号: 530
42.	P14A N32S S42N V147A A194V K238R	配列番号: 532
43.	P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 534
44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538
46.	P14A S42N A194V I275V	配列番号: 540
47.	E9G P14A S42N T190A	配列番号: 542

20

30

を有することによって配列番号2のポリペプチドとは異なる、K R E Dポリペプチドに関する。

【 0 0 1 9 】

なおさらに好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号2のポリペプチドよりも9～約25倍高いケトレダクターゼ活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 2 0 】

【 化 3 】

40

35.	P14A S42N V147A A194V K238R I275V	配列番号: 518
36.	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	配列番号: 520
39.	P14A S42N V147A A194V K238R	配列番号: 526
40.	N7K P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 528
44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538
46.	P14A S42N A194V I275V	配列番号: 540

を有することによって配列番号2のポリペプチドとは異なる、K R E Dポリペプチドに関する。

【 0 0 2 1 】

50

最も好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号 2 のポリペプチドよりも 1.3 ~ 約 2.5 倍高いケトレダクターゼ活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【0022】

【化 4】

44. E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G 配列番号: 536

45. E9G P14A S42N T190A A194V 配列番号: 538

を有することによって配列番号 2 のポリペプチドとは異なる、K R E D ポリペプチドに関する。

【0023】

別の局面において、本発明は、配列番号 2 のポリペプチドよりも 1.5 ~ 約 2.5 倍高いケトレダクターゼ活性を有する K R E D ポリペプチドに関し、そして、この K R E D ポリペプチドは、

(a) 配列番号 224、配列番号 244、配列番号 246、配列番号 250、配列番号 252、配列番号 254、配列番号 256、配列番号 260、配列番号 304、配列番号 344、配列番号 354、配列番号 358、配列番号 360、配列番号 364、配列番号 368、配列番号 374、配列番号 382、配列番号 386、配列番号 388、配列番号 400、配列番号 408、配列番号 438、配列番号 440、配列番号 448、配列番号 470、配列番号 484、配列番号 486、配列番号 488、配列番号 490、配列番号 502、配列番号 506、配列番号 508、配列番号 512、配列番号 514、配列番号 516、配列番号 518、配列番号 520、配列番号 522、配列番号 524、配列番号 526、配列番号 528、配列番号 530、配列番号 532、配列番号 534、配列番号 536、配列番号 538、配列番号 540、または配列番号 542 のアミノ酸配列と、少なくとも 90% の相同性、好ましくは少なくとも 95% の相同性、より好ましくは少なくとも 97%、そして、最も好ましくは少なくとも 99% の相同性を有するアミノ酸配列（以下「相同ポリペプチド」）を有するか；

(b) (i) 配列番号 223、配列番号 243、配列番号 245、配列番号 249、配列番号 251、配列番号 253、配列番号 255、配列番号 259、配列番号 303、配列番号 343、配列番号 353、配列番号 357、配列番号 359、配列番号 363、配列番号 367、配列番号 373、配列番号 381、配列番号 385、配列番号 387、配列番号 399、配列番号 407、配列番号 437、配列番号 439、配列番号 447、配列番号 469、配列番号 483、配列番号 485、配列番号 487、配列番号 489、配列番号 501、配列番号 505、配列番号 507、配列番号 511、配列番号 513、配列番号 515、配列番号 517、配列番号 519、配列番号 521、配列番号 523、配列番号 525、配列番号 527、配列番号 529、配列番号 531、配列番号 533、配列番号 535、配列番号 537、配列番号 539、または配列番号 541 のヌクレオチド配列、(ii) 少なくとも 100 ヌクレオチドの (i) の部分配列、または、(iii) (i) もしくは (ii) の相補鎖のうちのいずれかと、中程度のストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズする核酸配列によってコードされるか（例えば、J. Sambrook, E. F. Fritsch および T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, N. Y. 参照のこと）；

(c) 1 ~ 6 個のアミノ酸の置換、欠失、および / または挿入を含む、配列番号 224、配列番号 244、配列番号 246、配列番号 250、配列番号 252、配列番号 254、配列番号 256、配列番号 260、配列番号 303、配列番号 344、配列番号 354、配列番号 358、配列番号 360、配列番号 364、配列番号 368、配列番号 374、配列番号 382、配列番号 386、配列番号 388、配列番号 400、配列番号 408、配列番号 438、配列番号 440、配列番号 448、配列番号 470、配列番号 484、配列番号 486、配列番号 488、配列番号 490、配列番号 502、配列番号 506、配列番号 508、配列番号 512、配列番号 514、配列番号 516、配列番号 518

10

20

30

40

50

、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、および配列番号 5 4 2 のポリペプチド改変体であるか；

(d) 配列番号 2 2 4、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、または配列番号 5 4 2 のポリペプチドからの少なくとも 2 2 0 アミノ酸残基のフラグメントであるか；あるいは、

(e) 5 0 にて pH 7 で 6 0 分間インキュベーションした後に、最初の K R E D 活性の 6 0 % より多くを保持する、(a)、(b)、(c) または (d) のポリペプチドであるか；

のいずれかである、K R E D ポリペプチドである。

【 0 0 2 4 】

本発明の新規 K R E D ポリペプチドはまた、野生型ケトレダクターゼ (配列番号 2) よりも熱安定性を高められている。熱安定性は、細胞溶解産物を 5 0 にて 2 0 ~ 2 4 時間熱処置 (本明細書中以下で、熱処置) した後に残存する、初期の (未処置) K R E D 活性 (例えば、実施例 4) の百分率で決定された。比較によると、配列番号 2 の K R E D ポリペプチド骨格 (C R 2 - 5) は、熱処理後、その初期の K R E D 活性の 1 0 % が維持された。従って、熱処置後、その処理前の活性を 2 0 % 超えた K R E D 活性を示した K R E D ポリペプチドはいずれも、熱安定性が高められたと考えられた。好ましくは、本発明の K R E D ポリペプチドの熱処理後に残存する K R E D 活性は、少なくとも 5 0 % の活性 (すなわち、処理前の活性の少なくとも 5 0 %)、そして最も好ましくは少なくとも 1 0 0 % の活性 (熱処理前後の活性が等しい) であった。 (配列番号 2) の野生型 K R E D ポリペプチドである C R 2 - 5 における K R E D 活性と比較した本発明の K R E D ポリペプチド改変体についての「活性」を、表 1 に列挙している。種々の K R E D ポリペプチドの各々の細胞溶解産物を 5 0 にて 2 0 ~ 2 4 時間熱処理した後の、本発明の種々の K R E D ポリペプチドについての熱安定性もまた、表 1 に列挙している。

【 0 0 2 5 】

従って、高められた熱安定性と高められた K R E D 活性との組合せに基づくと、本発明の好ましい K R E D ポリペプチドは、配列番号 9 2、配列番号 9 8、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 8、配列番号 2 7 0、配列番号 2 7 6、配列番号 2 8 8、配列番号 2 9 4、配列番号 3 0 0、配列番号 3 0 2、配列番号 3 0 4、配列番号 3 1 0、配列番号 3 1 8、配列番号 3 2 4、配列番号 3 2 8、配列番号 3 3 2、配列番号 3 3 4、配列番号 3 4 4、配列番号 5 0 6、配列番号 5 2 6、または配列番号 5 4 2 を有する。また、配列番号 9 2、配列番号 9 8、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 8、配列番号 2 7 0、配列番号 2 7 6、配列番号 2 8 8、配列番号 2 9 4、配列番号 3 0 0、配列番号 3 0 2、配列番号 3 0 4、配列番号 3 1 0、配列番号 3 1 8、配列番号 3 2 4、配列番号 3 2 8、配列番号 3 3 2、配列番号 3 3 4、配列番号 3 4 4、配列番号 5 0 6、配列番号 5 2 6、または配列番号 5 4 2 の K R E D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド (例えば、それぞれ、配列番号 9 1、配列番号 9 7、配列番号 2 6 3、配列番号 2 6 7、配列番号 2 6 9、配列番号 2 7 5、配列番号 2 8 7、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 9、配列番号 3 0 1、配列番号 3 0 3、配列番号 3 0 9、配列番号 3 1 7、配列番号 3 2 3、配列番号 3 2 7、配列番号 3 3 1、配列番号 3 3 3、配列番号 5 0 5、配列番号 5 2 5、または配列番号 5 4 1 のポリヌクレオチド、または、それらのコドンをも最適化したバージョン) も本発明の範囲内である

10

20

30

40

50

。

【 0 0 2 6 】

増強された K R E D 活性に基づいた別の実施形態において、本発明の好ましい K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 の K R E D 活性の少なくとも 1 5 1 % を有し、そして、この K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 6 2、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 6、配列番号 2 6 8、配列番号 2 7 0、配列番号 2 7 2、配列番号 2 7 4、配列番号 2 7 6、配列番号 2 7 8、配列番号 2 8 0、配列番号 2 8 2、配列番号 2 8 4、配列番号 2 8 6、配列番号 2 8 8、配列番号 2 9 0、配列番号 2 9 2、配列番号 2 9 4、配列番号 2 9 6、配列番号 2 9 8、配列番号 3 0 0、配列番号 3 0 2、配列番号 3 0 4、配列番号 3 0 6、配列番号 3 0 8、配列番号 3 1 0、配列番号 3 1 2、配列番号 3 1 4、配列番号 3 1 6、配列番号 3 1 8、配列番号 3 2 0、配列番号 3 2 2、配列番号 3 2 4、配列番号 3 2 6、配列番号 3 2 8、配列番号 3 3 0、配列番号 3 4 4、配列番号 3 3 2、配列番号 3 3 4、配列番号 3 3 6、配列番号 3 3 8、配列番号 3 4 0、配列番号 3 4 2、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 3 9 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、または配列番号 5 4 2 のアミノ酸配列を有する。本発明のさらに好ましい K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 の K R E D 活性の少なくとも 5 0 0 % を有し、そして、この K R E D ポリペプチドは、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、または配列番号 5 4 2 のアミノ酸配列を有する。同様に、本発明はまた、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、または 5 4 2 の K R E D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、それぞれ、配列番号 4 8 3、配列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、配列番号 5 1 5、配列番号 5 1 7、配列番号 5 1 9、配列番号 5 2 1、配列番号 5 2 3、配列番号 5 2 5、配列番号 5 2 7、配列番号 5 2 9、配列番号 5 3 1、配列番号 5 3 3、配列番号 5 3 5、配列番号 5 3 7、配列番号 5 3 9、または配列番号 5 4 1 のポリヌクレオチド）に関する。

【 0 0 2 7 】

高められた K R E D 活性および / または高められた熱安定性をもたらすように置換されている、配列番号 2 の K R E D ポリペプチド (*C a n d i d a m a g n o l i a s e* 供給源) の種々の残基位置は、本明細書中の表 4 に要約される。高められた K R E D 活性および / または 5 0 における熱安定性の実証されている、多数の発明性のある K R E D ポリペプチドについてのアミノ酸配列は、配列番号 4 2、配列番号 4 4、配列番号 4 6、配列番号 4 8、配列番号 5 0、配列番号 5 2、配列番号 5 4、配列番号 5 6、配列番号 5 8、配列番号 6 0、配列番号 6 2、配列番号 6 4、配列番号 6 6、配列番号 6 8、配列番号 7 0、配列番号 7 2、配列番号 7 4、配列番号 7 6、配列番号 7 8、配列番号 8 0、配列番号 8 2、配列番号 8 4、配列番号 8 6、配列番号 8 8、配列番号 9 0、配列番号 9 2、配列番号 9 4、配列番号 9 6、配列番号 9 8、配列番号 1 2 4、配列番号 2 0 6、配列番

号 2 2 4、配列番号 2 2 6、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 3 9 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、または配列番号 5 4 2 として本明細書中に開示される。 10

【 0 0 2 8 】

第二の局面において、本発明は、上述の発明性のある K R E D ポリペプチドのうちの一つをコードするポリヌクレオチド配列（例えば、それぞれ、配列番号 4 1、配列番号 4 3、配列番号 4 5、配列番号 4 7、配列番号 4 9、配列番号 5 1、配列番号 5 3、配列番号 5 5、配列番号 5 7、配列番号 5 9、配列番号 6 1、配列番号 6 3、配列番号 6 5、配列番号 6 7、配列番号 6 9、配列番号 7 1、配列番号 7 5、配列番号 7 7、配列番号 7 9、配列番号 8 1、配列番号 8 3、配列番号 8 5、配列番号 8 7、配列番号 8 9、配列番号 9 1、配列番号 9 3、配列番号 9 5、配列番号 9 7、配列番号 1 2 3、配列番号 2 0 5、配列番号 2 2 3、配列番号 2 2 5、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 5、配列番号 2 5 9、配列番号 2 6 1、配列番号 2 6 3、配列番号 2 6 5、配列番号 2 6 7、配列番号 2 6 9、配列番号 2 7 1、配列番号 2 7 3、配列番号 2 7 5、配列番号 2 7 7、配列番号 2 7 9、配列番号 2 8 1、配列番号 2 8 3、配列番号 2 8 5、配列番号 2 8 7、配列番号 2 8 9、配列番号 2 9 1、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 5、配列番号 2 9 7、配列番号 2 9 9、配列番号 3 0 1、配列番号 3 0 3、配列番号 3 0 5、配列番号 3 0 7、配列番号 3 0 9、配列番号 3 1 1、配列番号 3 1 3、配列番号 3 1 5、配列番号 3 1 7、配列番号 3 1 9、配列番号 3 2 1、配列番号 3 2 3、配列番号 3 2 5、配列番号 3 2 7、配列番号 3 2 9、配列番号 3 4 3、配列番号 3 3 1、配列番号 3 3 3、配列番号 3 3 5、配列番号 3 3 7、配列番号 3 3 9、配列番号 3 4 1、配列番号 3 4 3、配列番号 3 5 3、配列番号 3 5 7、配列番号 3 5 9、配列番号 3 6 3、配列番号 3 6 7、配列番号 3 7 3、配列番号 3 8 1、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 7、配列番号 3 9 7、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0 7、配列番号 4 3 7、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4 7、配列番号 4 6 9、配列番号 4 8 3、配列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、配列番号 5 1 5、配列番号 5 1 7、配列番号 5 1 9、配列番号 5 2 1、配列番号 5 2 3、配列番号 5 2 5、配列番号 5 2 7、配列番号 5 2 9、配列番号 5 3 1、配列番号 5 3 3、配列番号 5 3 5、配列番号 5 3 7、配列番号 5 3 9、または配列番号 5 4 1 のポリヌクレオチド）のいずれにも関する。 20 30

【 0 0 2 9 】

好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 2 2 3、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 5、配列番号 2 5 9、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 3、配列番号 3 5 3、配列番号 3 5 7、配列番号 3 5 9、配列番号 3 6 3、配列番号 3 6 7、配列番号 3 7 3、配列番号 3 8 1、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 7、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0 7、配列番号 4 3 7、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4 7、配列番号 4 6 9、配列番号 4 8 3、配列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、配列番号 5 1 5、配列番号 5 1 7、配列番号 5 1 9、配列番号 5 2 1、配列番号 5 2 3、配列番号 5 2 5、配列番号 5 2 7、配列番号 5 2 9、配列番号 5 3 1、配列番号 5 3 3、配列番号 5 3 5、配列番号 5 3 7、配列番号 5 3 9、または配列番号 5 4 1 のポリヌクレオチドに関し、それぞれが、配列番号 2 2 4、配列番号 2 4 4、 40 50

配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 4、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0 または配列番号 5 4 2 の新規性のある K R E D ポリペプチドをコードする。

10

【 0 0 3 0 】

さらに好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 4 8 3、配列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、または配列番号 5 2 5 のポリヌクレオチドに関し、それぞれが、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、または配列番号 5 2 6 の K R E D ポリペプチドをコードする。

【 0 0 3 1 】

なおさらに好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 5 0 5、配列番号 5 1 9、配列番号 5 2 5、配列番号 5 3 5、および配列番号 5 3 7 のポリヌクレオチドに関し、それぞれが、配列番号 5 0 6、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 6、配列番号 5 3 6、および配列番号 5 3 8 の K R E D ポリペプチドをコードする。

20

【 0 0 3 2 】

第三の局面において、本発明は、核酸構築物、ベクター、または、プロモーターに作動可能に連結した本発明の K R E D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を含む宿主細胞に関する。

【 0 0 3 3 】

第四の局面において、本発明は、

(a) ポリペプチドの産生のために適切な条件下で、本発明の K R E D ポリペプチドをコードする核酸配列を含む核酸構築物を含む宿主細胞を培養する工程；および

30

(b) そのポリペプチドを回収する工程

を包含する、本発明の K R E D ポリペプチドを作製する方法に関する。

【 0 0 3 4 】

前述の要旨、および本発明の特定の実施形態の以下の詳細な説明は、添付された図面とともに読む場合、より一層理解される。本発明を図示する目的で、図面中に、特定の実施形態が示される。しかしながら、添付された図面中に示された配置および手段は、本発明を限定するものでないことが理解されるべきである。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 5 】

(発明の詳細な説明)

40

本明細書中に用いられる場合、用語「ケトレダクターゼ」および「K R E D」は、ケトンの還元を触媒する能力を有するポリペプチドについて本明細書中で援用するために互換可能に用いられる。好ましくは、 - ケト酸中のケトンが、還元剤として還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (N A D H) または還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリッ酸 (N A D P H) を利用して、立体特異的様式で、対応する - ヒドロキシ酸になる。

【 0 0 3 6 】

本発明は、多様な局面を有する。一つの局面において、本発明は、配列番号 2 の K R E D と比較して増強された K R E D 活性を有するケトレダクターゼ (「 K R E D 」) ポリペプチドに関し、このポリペプチドは、配列番号 2 の K R E D 活性の好ましくは少なくとも

50

1.5倍、代表的には1.5～50倍、より代表的には1.5～約25倍の活性を有する。このような活性は、NADPHが酸化されて同時にケトンが対応するアルコールに還元されることに起因する、NADPHの吸光度の減少またはNADPHの蛍光の減少から測定される。別の局面において、本発明は、配列番号2のポリペプチドの1.5倍、代表的には1.5～約25倍のKRED活性を有するKREDポリペプチドに関し、このような活性は、NADPHの吸光度またはNADPHの蛍光の減少から測定されるか（例えば、実施例4）、あるいは、結合アッセイにおいて生成された産物から測定される（例えば、実施例5）。このKREDポリペプチドは、配列番号506、配列番号520、配列番号526、配列番号536、および配列番号538のアミノ酸配列と、少なくとも90%、好ましくは少なくとも95%、より好ましくは少なくとも97%、そして、最も好ましくは少なくとも99%相同である。 10

【0037】

一つの実施形態において、本発明はまた、本明細書中のどこかに記載される、単離されかつ精製された形態のKREDポリペプチド改変体に関する。別の実施形態において、本発明は、本明細書中に記載された凍結乾燥形態のKREDポリペプチド改変体に関する。なお別に実施形態において、本発明は、本明細書中に記載されるKREDポリペプチド改変体および適切なキャリア（代表的には緩衝溶液、より代表的には6.0と8.0との間のpHを有する緩衝溶液）を含む組成物に関する。

【0038】

別の局面において、本発明は、KREDポリペプチド（好ましくは、単離されかつ精製された）に関し、このKREDポリペプチドは、配列番号2のポリペプチドの少なくとも1.5倍、代表的には1.5～50倍、より代表的には1.5～25倍のKRED活性を有し、そして、このKREDポリペプチドは、A2V；K3E；F5LまたはF5C；N7K；E9GまたはE9K；A12V；P13L；P14A；A16GまたはA16V；T18A；K19I；N20DまたはN20S；E21K；S22NまたはS22T；Q24HまたはQ24R；V25A；N32SまたはN32D；A36T；S41G；S42N；I45L；A48T；V56A；V60I；Y64H；N65K、N65D、N65YまたはN65S；S66GまたはS66R；H67LまたはH67Q；D68GまたはD68N；G71D；E74KまたはE74G；K78R；K79R；K85R；A86V；N90D；S93NまたはS93C；D95N、D95G、D95V、D95YまたはD95E；K98R；Q99L、Q99R、またはQ99H；T100A；I101V；Q103R；I105VまたはI105T；K106RまたはK106Q；H110Y、H110CまたはH110R；V114A；A116G；I120V；K124R；D129GまたはD129N；D131GまたはD131V；D132N；K134M、K134V、K134EまたはK134R；D137NまたはD137G；Q138L；V140I；D143N；L144F；K145R；V147A；V150A；H153YまたはH153Q；H157Y；F158LまたはF158Y；R159K；E160GまたはE160V；F162YまたはF162S；E163GまたはE163K；E165D、E165GまたはE165K；K167IまたはK167R；A170S；V172I；F173C；M177VまたはM177T；H180Y；V184I；T190A；A193V；A194V；F201L；K203R；F209Y；V218I；N224S；E226K、E226GまたはE226D；S228T；D229A；V231IまたはV231A；Q223KまたはQ223R；E234GまたはE234D；T235KまたはT235A；N237Y；K238RまたはK238E；T251A；V255A；F260L；A262V；T272A；I274L；I275LまたはI275V；およびP283Rのうちの1～20個の残基の変化、好ましくは1～7個の残基の変化を有する配列番号2のアミノ酸配列を有する。 20 30 40

【0039】

別に指定がなければ、用語「同一性パーセント」、「同一性%」、「同一性パーセント」および「同一性%」は、アミノ酸配列同一性%について本明細書中で援用するために互 50

換可能に用いられ得る。このアミノ酸配列同一性%は、Needleman Wunsch global alignment algorithmを用いて決定される。すなわち、Global Alignment Scoring Matrix (導入ギャップ = -22.183 および伸長ギャップ = -1.396 のギャップペナルティを有する PAM120 マトリックス; 同一性% = 部分一致を示すアライメント (ギャップを有する) (p) において第一配列の長さで割った、第一配列と第二配列との間の同一残基の数のための動的計画法アルゴリズム)を用いて決定された。Needleman, S. B. および Wunsch, C. D. 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48: 443 ~ 453 (1970) を参照のこと。

10

【0040】

使用にあたって、本発明の増強された KRED ポリペプチドは、好ましくは、KRED ポリペプチドのための補因子の継続的な供給源を提供する補因子再生系と共役される。図1を参照のこと。本明細書中で用いられる「補因子」とは、目的の反応を触媒するよう酵素と相乗的に作用する非タンパク化合物をいう。例えば、補因子 NADH または NADPH は、酵素 (例えば、本発明の KRED ポリペプチド) とともに利用され、そして、3-ケト-酪酸エステル/アミドの立体特異的還元を触媒し、それらの対応する 3-ヒドロキシ酪酸エステル/アミドとし、かつ、 α -ハロケトンとそれらの対応するハロヒドリンとし、そして補因子再生系 (例えば、グルコースデヒドロゲナーゼ/グルコース) とともに利用される。

20

【0041】

用語「補因子再生系」とは、本明細書中において、利用された補因子をその反応前の状態へ戻すよう再生する反応に関与する一連の反応物をいう。ある一つの例は、酸化された補因子 NAD または NADP を補因子の還元された形態 (例えば、それぞれ、NADH および NADPH) に戻す再生である。次いで還元された (再生された) 補因子は、還元された基質および酸化された (利用された) 補因子を立体特異的に生成するために、基質および酵素 (例えば、ケトレダクターゼ) と再度反応できることが再度可能になる。後者は、補因子再生系によって再生される。適切な補因子再生系としては、グルコースとグルコースデヒドロゲナーゼ、ギ酸デヒドロゲナーゼとギ酸、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼとグルコース-6-リン酸、第二級アルコールデヒドロゲナーゼとイソプロピルアルコールなどが挙げられ、これらすべては、NADP/NADPH または NAD/NADH のいずれかとともに用いられる。従って、例えば、4-ハロ-3-ケト-酪酸エステルまたは 4-ハロ-3-ケト-酪酸アミドは、所望のヒドロキシ化合物および NADP (または NAD) を生成するために、本発明の KRED ポリペプチドおよび NADPH (または NADH) により還元される場合、生じた NADP (または NAD) は、グルコースおよび補因子再生系として作用するグルコースデヒドロゲナーゼの触媒量によって、還元されて (再生されて) その元の形態 (NADPH (または NADH)) に戻る。グルコース脱水素補因子再生系の上述の作用は、図1中に例示される。

30

40

【0042】

本明細書中で用いられる用語「共役した」は、ケトレダクターゼ基質の還元における補因子の還元型形態の使用のことをいう。そして、この用語は、同じ補因子の還元型形態を産出する補因子再生系の構成成分 (例えば、グルコース) の酸化において、上述の反応で産出した同じ補因子の酸化型を同時に使用することをいう。したがって、図1中では、ケトレダクターゼ酵素は、グルコースデヒドロゲナーゼ補因子再生系と共役されるように示される。

【0043】

上述の実施形態の好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号2のポリペプチドの1.5 ~ 約25倍の KRED 活性を有するが、以下のアミノ

50

酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 4 4 】

【 化 5 】

1.	S42N	配列番号: 224	
2.	S42N, K124R, A194V	配列番号: 244	
3.	S42N, A194V, K203R	配列番号: 246	
4.	S42N, E160G, A194V	配列番号: 250	
5.	S42N, D95Y	配列番号: 252	
6.	S42N, A194V	配列番号: 254	
7.	S42N, V140I, F158L, M177T, V184I	配列番号: 256	
8.	H67Q, F158Y, T235K	配列番号: 260	10
9.	S42N, A194V, T235K	配列番号: 354	
10.	E21K, S42N, K78R, A194V	配列番号: 358	
11.	S42N, E163K, A194V	配列番号: 360	
12.	S42N, V184I, A194V, T235K	配列番号: 364	
13.	N7K, S42N, A194V	配列番号: 368	
14.	S42N, D129N, A194V	配列番号: 374	
15.	E9K, S42N, A194V	配列番号: 382	
16.	S42N, D131G, A194V	配列番号: 386	
17.	S42N, D131V, A194V	配列番号: 388	
18.	S42N, D131G, A194V, T235K	配列番号: 400	
19.	S42N, Q103R, A194V	配列番号: 408	
20.	E9K, S42N, A194V, K238R	配列番号: 438	20
21.	S42N, V184I, A194V	配列番号: 440	
22.	E9K, S42N, N90D, A194V	配列番号: 448	
23.	E9K, S42N, D131G, A194V, Q233R	配列番号: 470	
24.	E9K, S42N, D137N, D143N, A194V, K238R	配列番号: 484	
25.	E9K, S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 486	
26.	E9K, S42N, S66R, A194V, F201L, K238R	配列番号: 488	
27.	S42N, A194V, K238E	配列番号: 490	
28.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 498	
29.	P14A, S42N, A194V	配列番号: 502	
30.	P14A, S42N, T190A, A194V	配列番号: 506	
31.	E9K S42N D137N D143N V147A A194V K238R	配列番号: 508	
32.	P14A, S42N, V147A, A194V, I275V	配列番号: 512	30
33.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 514	
34.	P14A, S42N, G71D, V147A A194V K238R	配列番号: 516	
35.	P14A S42N V147A A194V K238R I275V	配列番号: 518	
36.	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	配列番号: 520	
37.	P14A S42N T190A A194V	配列番号: 522	
38.	P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 524	
39.	P14A S42N V147A A194V K238R	配列番号: 526	
40.	N7K P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 528	
41.	P14A S42N V147A A194V	配列番号: 530	
42.	P14A N32S S42N V147A A194V K238R	配列番号: 532	
43.	P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 534	40
44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536	
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538	
46.	P14A S42N A194V I275V	配列番号: 540	
47.	E9G P14A S42N T190A	配列番号: 542	

を有することにより配列番号 2 のポリペプチドとは異なる、K R E D ポリペプチドに関する。

【 0 0 4 5 】

さらに好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号 2 のポリペプチドの 5 ~ 約 25 倍の K R E D 活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 4 6 】

【 化 6 】

24.	E9K, S42N, D137N, D143N, A194V, K238R	配列番号: 484
25.	E9K, S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 486
26.	E9K, S42N, S66R, A194V, F201L, K238R	配列番号: 488
27.	S42N, A194V, K238E	配列番号: 490
28.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 498
29.	P14A, S42N, A194V	配列番号: 502
30.	P14A, S42N, T190A, A194V	配列番号: 506
31.	E9K S42N D137N D143N V147A A194V K238R	配列番号: 508
32.	P14A, S42N, V147A, A194V, I275V	配列番号: 512
33.	S42N, V147A, A194V, K238R	配列番号: 514
34.	P14A, S42N, G71D, V147A A194V K238R	配列番号: 516
35.	P14A S42N V147A A194V K238R I275V	配列番号: 518
36.	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	配列番号: 520
37.	P14A S42N T190A A194V	配列番号: 522
38.	P14A S42N V147A, A194V I275V	配列番号: 524
39.	P14A S42N V147A A194V K238R	配列番号: 526
40.	N7K P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 528
41.	P14A S42N V147A A194V	配列番号: 530
42.	P14A N32S S42N V147A A194V K238R	配列番号: 532
43.	P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 534
44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538
46.	P14A S42N A194V I275V	配列番号: 540
47.	E9G P14A S42N T190A	配列番号: 542

10

20

を有することにより配列番号 2 のポリペプチドとは異なる、K R E D ポリペプチドに関する。

【 0 0 4 7 】

なおさらに好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号 2 のポリペプチドの 9 ~ 約 2.5 倍のケトレダクターゼ活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 4 8 】

【 化 7 】

35.	P14A S42N V147A A194V K238R I275V	配列番号: 518
36.	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	配列番号: 520
39.	P14A S42N V147A A194V K238R	配列番号: 526
40.	N7K P14A S42N V147A A194V I275V	配列番号: 528
44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538
46.	P14A S42N A194V I275V	配列番号: 540

30

を有することにより配列番号 2 のポリペプチドとは異なる、K R E D ポリペプチドに関する。

40

【 0 0 4 9 】

最も好ましい局面において、本発明は、溶解産物として測定された場合に配列番号 2 のポリペプチドの 1.3 ~ 約 2.5 倍のケトレダクターゼ活性を有するが、以下のアミノ酸置換セットのうちの一つを有することおよび対応する配列番号

【 0 0 5 0 】

【 化 8 】

44.	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	配列番号: 536
45.	E9G P14A S42N T190A A194V	配列番号: 538

を有することにより配列番号 2 のポリペプチドとは異なる、K R E D ポリペプチドに関する。

50

【 0 0 5 1 】

本発明の K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 の C . m a g n o l i a e に由来する K R E D ポリペプチド骨格の K R E D 活性よりも、1 . 5 倍～約 2 5 倍高い増強された K R E D 活性（例えば、実施例 4 の方法によって測定される）を有する。そして、この K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 とは、1 個～2 0 個のアミノ酸残基、代表的には、1 個～1 0 個のアミノ酸残基、より代表的には、1 個～9 個のアミノ酸残基、さらにより代表的には、1 個～8 個のアミノ酸残基、最も代表的には、1 個～7 個のアミノ酸残基異なる。好ましくは、本発明の K R E D ポリペプチドは、配列番号 2 の K R E D ポリペプチド骨格の K R E D 活性よりも、9 倍～約 2 5 倍高い、より好ましくは、1 3 倍～約 2 5 倍高い増強された K R E D 活性を有する。

10

【 0 0 5 2 】

別の局面において、本発明は、配列番号 2 のポリペプチドの 1 . 5 ～約 2 5 倍のケトレダクターゼ活性を有する配列番号 2 の K R E D ポリペプチドに関し、そして、この K R E D ポリペプチドは、

（ a ）配列番号 2 2 4、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 4、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 6、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0、または配列番号 5 4 2 のアミノ酸配列と、少なくとも 9 0 % の同一性、好ましくは少なくとも 9 5 % の同一性、より好ましくは少なくとも 9 7 %、そして、最も好ましくは少なくとも 9 9 % の同一性を有するアミノ酸配列（以下「相同ポリペプチド」）を有するか；

20

（ b ）（ i ）配列番号 2 2 3、配列番号 2 4 3、配列番号 2 4 5、配列番号 2 4 9、配列番号 2 5 1、配列番号 2 5 3、配列番号 2 5 5、配列番号 2 5 9、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 3、配列番号 3 5 3、配列番号 3 5 7、配列番号 3 5 9、配列番号 3 6 3、配列番号 3 6 7、配列番号 3 7 3、配列番号 3 8 1、配列番号 3 8 5、配列番号 3 8 7、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0 7、配列番号 4 3 7、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4 7、配列番号 4 6 9、配列番号 4 8 3、配列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、配列番号 5 1 5、配列番号 5 1 7、配列番号 5 1 9、配列番号 5 2 1、配列番号 5 2 3、配列番号 5 2 5、配列番号 5 2 7、配列番号 5 2 9、配列番号 5 3 1、配列番号 5 3 3、配列番号 5 3 5、配列番号 5 3 7、配列番号 5 3 9、または配列番号 5 4 1 のヌクレオチド配列、（ i i ）少なくとも 1 0 0 ヌクレオチドの（ i ）の部分配列、または（ i i i ）（ i ）もしくは（ i i ）の相補鎖

30

のうちのいずれかと、中程度のストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズする核酸配列によってコードされるか（例えば、J . S a m b r o o k , E . F . F r i t s c h および T . M a n i a t i s , 1 9 8 9 , M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l , 第二版、C o l d S p r i n g H a r b o r , N . Y . 参照のこと）；

40

（ c ）1 ～ 6 個のアミノ酸の置換、欠失、および / または挿入を含む、配列番号 2 2 4、配列番号 2 4 4、配列番号 2 4 6、配列番号 2 5 0、配列番号 2 5 2、配列番号 2 5 4、配列番号 2 5 6、配列番号 2 6 0、配列番号 3 0 3、配列番号 3 4 4、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号 3 8 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4

50

、配列番号 486、配列番号 488、配列番号 490、配列番号 502、配列番号 506、配列番号 508、配列番号 512、配列番号 514、配列番号 516、配列番号 518、配列番号 520、配列番号 522、配列番号 524、配列番号 526、配列番号 528、配列番号 530、配列番号 532、配列番号 534、配列番号 536、配列番号 538、配列番号 540 または配列番号 542 のポリペプチドの改変体であるか；

(d) 配列番号 224、配列番号 244、配列番号 246、配列番号 250、配列番号 252、配列番号 254、配列番号 256、配列番号 260、配列番号 303、配列番号 344、配列番号 354、配列番号 358、配列番号 360、配列番号 364、配列番号 368、配列番号 374、配列番号 382、配列番号 386、配列番号 388、配列番号 400、配列番号 408、配列番号 438、配列番号 440、配列番号 448、配列番号 470、配列番号 484、配列番号 486、配列番号 488、配列番号 490、配列番号 502、配列番号 506、配列番号 508、配列番号 512、配列番号 514、配列番号 516、配列番号 518、配列番号 520、配列番号 522、配列番号 524、配列番号 526、配列番号 528、配列番号 530、配列番号 532、配列番号 534、配列番号 536、配列番号 538、配列番号 540、または配列番号 542 のポリペプチドからの少なくとも 220 アミノ酸残基のフラグメントであるか；あるいは、

(e) 50 にて pH7 で 60 分間インキュベーションした後に、最初の KRED 活性の 60% より多くを保持する、(a)、(b)、(c) または (d) のポリペプチドであるか；

のいずれかである。

【0053】

本発明の新規 KRED ポリペプチドはまた、野生型ケトレダクターゼ (配列番号 2) よりも熱安定性を高められている。熱安定性は、細胞溶解産物を pH7 で 50 にて 20 時間 ~ 24 時間熱処置 (本明細書中以下で、熱処置) した後に残存する、初期の (未処置) KRED 活性の百分率 (例えば、実施例 4) で決定された。比較によると、配列番号 2 の野生型 KRED ポリペプチド (CR2-5) は、熱処理後、その初期の KRED 活性の 10% が維持された。従って、熱処置後、その処理前の活性の 20% を超えた KRED 活性を示した KRED ポリペプチドはいずれも、熱安定性が高められたと考えられた。好ましくは、本発明の KRED ポリペプチド改変体の熱処理後の KRED 活性は、少なくとも 50% の残存活性、そして最も好ましくは 100% の活性 (熱処理前後の活性が等しい) であった。(配列番号 2) の野生型 KRED ポリペプチドである CR2-5 における KRED 活性と比較した本発明の KRED ポリペプチド改変体についての「活性%」を、表 1 に列挙している。種々の KRED ポリペプチドの各々の細胞溶解産物を 50 にて 20 時間 ~ 24 時間熱処理した後の、本発明の種々の KRED ポリペプチドについての熱安定性もまた、表 1 に列挙している。

【0054】

【表 1】

表1

配列番号	アミノ酸変異	コントロールを超える 活性%	熱処理後の熱安定性
76	H67Q F158Y	*	-
124	H67Q V140I F158Y K167I V172I M177V V184I	*	-
224	S42N	*	-
254	S42N A194V	*	+
344	S42N A194V	*	+
354	S42N A194V T235K	*	-
440	S42N V184I A194V	*	+
470	E9K S42N D131G A194V Q233R	*	-
486	E9K S42N V147A A194V K238R	**	-
506	P14A S42N T190A A194V	**	++
520	P14A N20D S42N V147A A194V I275V	***	-
526	P14A S42N V147A A194V K238R	***	++
536	E9G P14A N20S S42N T190A A194V E234G	****	-
538	E9G P14A S42N T190A A194V	****	-
540	P14A S42N A194V I275V	****	-
542	E9G P14A S42N T190A	**	++

*の場合 = 配列番号2の150～500%の活性
 ** = 配列番号2の500～900%の活性
 *** = 配列番号2の900～1300%の活性
 **** = 配列番号2の1300%を超える活性
 - = 熱処理後の活性が未処理クローンの20%未満
 + = 熱処理後の活性が未処理クローンと比較して20～50%
 ++ = 熱処理後の活性が未処理クローンと比較して50～100%

10

20

30

従って、増強された熱安定性および増強されたKRED活性の組合せに基づき、本発明の好ましいKREDポリペプチドは、配列番号344、配列番号440、配列番号506、配列番号526、または配列番号542を有する。配列番号344、配列番号440、配列番号506、配列番号526、または配列番号542のKREDポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、それぞれ配列番号343、配列番号439、配列番号505、配列番号525、または配列番号541、あるいは、それらのコドン最適化バージョン）もまた本発明の範囲内である。

【0055】

増強されたKRED活性に基づいた別の実施形態において、本発明の好ましいKREDポリペプチドは、配列番号2のKRED活性の少なくとも151%を有し、そして、このKREDポリペプチドは、配列番号262、配列番号264、配列番号266、配列番号268、配列番号270、配列番号272、配列番号274、配列番号276、配列番号278、配列番号280、配列番号282、配列番号284、配列番号286、配列番号288、配列番号290、配列番号292、配列番号294、配列番号296、配列番号298、配列番号300、配列番号302、配列番号304、配列番号306、配列番号308、配列番号310、配列番号312、配列番号314、配列番号316、配列番号318、配列番号320、配列番号322、配列番号324、配列番号326、配列番号328、配列番号330、配列番号344、配列番号332、配列番号334、配列番号336、配列番号338、配列番号340、配列番号342、配列番号354、配列番号358、配列番号360、配列番号364、配列番号368、配列番号374、配列番号

40

50

382、配列番号386、配列番号388、配列番号398、配列番号400、配列番号408、配列番号438、配列番号440、配列番号448、配列番号470、配列番号484、配列番号486、配列番号488、配列番号490、配列番号502、配列番号506、配列番号508、配列番号512、配列番号514、配列番号516、配列番号518、配列番号520、配列番号522、配列番号524、配列番号526、配列番号528、配列番号530、配列番号532、配列番号534、配列番号536、配列番号538、配列番号540、または配列番号542のアミノ酸配列を有する。本発明のさらに好ましいKREDポリペプチドは、配列番号2のKRED活性の少なくとも500%を有し、そして、このKREDポリペプチドは、配列番号484、配列番号486、配列番号488、配列番号490、配列番号502、配列番号506、配列番号508、配列番号512、配列番号514、配列番号516、配列番号518、配列番号520、配列番号522、配列番号524、配列番号526、配列番号528、配列番号530、配列番号532、配列番号534、配列番号536、配列番号538、配列番号540、または配列番号542のアミノ酸配列を有する。同様に、本発明はまた、配列番号484、配列番号486、配列番号488、配列番号490、配列番号502、配列番号506、配列番号508、配列番号512、配列番号514、配列番号516、配列番号518、配列番号520、配列番号522、配列番号524、配列番号526、配列番号528、配列番号530、配列番号532、配列番号534、配列番号536、配列番号538、配列番号540、または542のKREDポリペプチドをコードするポリヌクレオチド（例えば、それぞれ、配列番号483、配列番号485、配列番号487、配列番号489、配列番号501、配列番号505、配列番号507、配列番号511、配列番号513、配列番号515、配列番号517、配列番号519、配列番号521、配列番号523、配列番号525、配列番号527、配列番号529、配列番号531、配列番号533、配列番号535、配列番号537、配列番号539、または配列番号541のポリヌクレオチド）に関する。

【0056】

本発明のさらに好ましいKREDポリペプチドは、配列番号2のKRED活性の少なくとも900%を有し、そして、配列番号518、配列番号520、配列番号526、配列番号528、配列番号536、配列番号538、または配列番号540のアミノ酸配列を有する。

【0057】

なおさらに好ましい本発明のKREDポリペプチドは、配列番号2のKRED活性の少なくとも1300%を有し、そして、配列番号536、配列番号538を有する。代表的には、本発明の上述のKREDポリペプチドは、溶解産物として測定された場合、配列番号2のKREDポリペプチドよりも2500%より少ないKRED活性を有する。上述で参照されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもまた好ましく、そして、このポリヌクレオチドは、このポリヌクレオチドがコードするポリペプチドよりもそれぞれ一桁の整数値である配列番号を有する。

【0058】

なお別の局面において、本発明は、共役化学反応において増強された活性を有するKREDポリペプチドに関する。

【0059】

別の実施形態において、本発明は、(i)配列番号223、配列番号243、配列番号245、配列番号249、配列番号251、配列番号253、配列番号255、配列番号259、配列番号303、配列番号343、配列番号353、配列番号357、配列番号359、配列番号363、配列番号367、配列番号373、配列番号381、配列番号385、配列番号387、配列番号399、配列番号407、配列番号437、配列番号439、配列番号447、配列番号469、配列番号483、配列番号485、配列番号487、配列番号489、配列番号501、配列番号505、配列番号507、配列番号511、配列番号513、配列番号515、配列番号517、配列番号519、配列番号

521、配列番号523、配列番号525、配列番号527、配列番号529、配列番号531、配列番号533、配列番号535、配列番号537、配列番号539、または配列番号541のヌクレオチド配列、(ii)少なくとも100ヌクレオチドの(i)の部分配列、または、(iii)(i)もしくは(ii)の相補鎖のうちのいずれかと、中程度のストリンジェンシー条件下においてハイブリダイズする核酸配列によってコードされるKREDポリペプチドに関する(J. Sambrook, E. F. Fritsch および T. Maniatis, 1989, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 第二版, Cold Spring Harbor, N.Y.)。

【0060】

長さが少なくとも100ヌクレオチドのポリヌクレオチドについて、低程度から最高程度までのストリンジェンシー条件が、以下のように定義され、その後、標準的なサザンブロット手順を実施する：(低程度のストリンジェンシーでは25%のホルムアミド、中程度および準高程度のストリンジェンシーでは35%のホルムアミド、または高程度および最高程度のストリンジェンシーでは50%のホルムアミドのうちのいずれかで、5×SSPE、0.3%SDS、切断かつ変性されたサケ精子DNA200μg/ml中において、42℃でプレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーション)。長さが少なくとも100ヌクレオチドのポリヌクレオチドについて、キャリア物質は、最終的に、少なくとも50℃で(低程度のストリンジェンシー)、少なくとも55℃で(中程度のストリンジェンシー)、少なくとも60℃で(準高程度のストリンジェンシー)、少なくとも65℃で(高程度のストリンジェンシー)、少なくとも70℃で(最高程度のストリンジェンシー)で、2×SSC、0.2%SDSを用いてそれぞれ15分間、三回洗浄される。

【0061】

別の実施形態において、本発明は、1～6個のアミノ酸の置換、欠失、および/または挿入を含む、配列番号224、配列番号244、配列番号246、配列番号250、配列番号252、配列番号254、配列番号256、配列番号260、配列番号303、配列番号344、配列番号354、配列番号358、配列番号360、配列番号364、配列番号368、配列番号374、配列番号382、配列番号386、配列番号388、配列番号400、配列番号408、配列番号438、配列番号440、配列番号448、配列番号470、配列番号484、配列番号486、配列番号488、配列番号490、配列番号502、配列番号506、配列番号508、配列番号512、配列番号514、配列番号516、配列番号518、配列番号520、配列番号522、配列番号524、配列番号526、配列番号528、配列番号530、配列番号532、配列番号534、配列番号536、配列番号538、配列番号540、または配列番号542のポリペプチド改変体に関する。このポリペプチド改変体は、配列番号2の野生型KREDのKRED活性の1.5倍～2.5倍を有する(例えば、実施例4の方法によって決定される)。好ましくは、アミノ酸の変化は軽度のものであり、すなわち、タンパク質の折り畳みおよび/または活性に有意な影響を与えない保存的なアミノ酸置換である。この保存的なアミノ酸置換は、わずかな欠失(代表的には1～6個のアミノ酸)、わずかなアミノ末端伸長もしくはわずかなカルボキシル末端伸長、小さなリンカーペプチド、あるいは、正味電荷または別の機能(例えば、ポリ-ヒスチジン路、抗原のエピトープもしくは結合領域)の変化によって、精製が促進するわずかな伸長である。

【0062】

保存的置換の例は、塩基性アミノ酸(アルギニン、リシンおよびヒスチジン)、酸性アミノ酸(グルタミン酸およびアスパラギン酸)、極性アミノ酸(グルタミンおよびアスパラギン)、疎水性アミノ酸(レクチン、イソロイシン、およびバリン)、芳香族アミノ酸(フェニルアラニン、トリプトファン、およびチロシン)、ならびに、低分子アミノ酸(グリシン、アラニン、セリン、スレオニン、プロリン、システイン、およびメチオニン)の群のうちである。一般的に当該分野で公知である特定の活性を変化させないアミノ酸置換が、(例えば、H. NeurathおよびR. L. Hill, 1979, The Pr

10

20

30

40

50

o t e i n s , A c a d e m i c P r e s s , N e w Y o r k . に記載される最も一般的に生じる交換は、A l a / S e r 、 V a l / I l e 、 A s p / G l u 、 T h r / S e r 、 A l a / G l y 、 A l a / T h r 、 S e r / A s n 、 A l a / V a l 、 S e r / G l y 、 T y r / P h e 、 A l a / P r o 、 L y s / A r g 、 A s p / A s n 、 L e u / I l e 、 L e u / V a l 、 A l a / G l u 、 および A s p / G l y 、 ならびに、これらの逆の交換である。

【 0 0 6 3 】

別の実施形態において、本発明は、配列番号 2 の野生型 K R E D の K R E D 活性の 1 . 5 ~ 約 2 5 倍を有する上述の (a) 、 (b) 、または (c) のフラグメントに関し、これらは、実施例 4 の方法によって決定された。「フラグメント」という用語は、カルボキシ末端、アミノ末端、またはその両方からの 1 ~ 1 0 個のアミノ酸残基の欠失を有するポリペプチドを意味する。好ましくは、この欠失は、カルボキシ末端からの 1 ~ 1 0 個の残基の欠失であり、より好ましくは、この欠失は、カルボキシ末端からの 1 ~ 5 個の残基の欠失である。

10

【 0 0 6 4 】

なお別の実施形態において、本発明は、上記の「詳細な説明」において記載されるような (a) 、 (b) または (c) の K R E D ポリペプチドに関する。この K R E D ポリペプチドは、5 0 、 p H 7 で 2 0 時間 ~ 2 4 時間インキュベーション後、最初の (インキュベーション前の) K R E D 活性を 2 0 % より高く維持する。好ましくは、本発明のポリペプチドは、その最初の活性の少なくとも 2 0 % を維持し、より好ましくは、5 0 、 p H 7 で 2 0 時間 ~ 2 4 時間インキュベーション後、最初の活性の少なくとも 5 0 % を維持する。熱処理前および熱処理後の溶解産物 (実施例 3 において調製されるような溶解産物) に関する最初の K R E D 活性および残存 K R E D 活性は、K R E D 活性アッセイ (例えば、本明細書中の実施例 4 において記載されるようなアッセイ) によって容易に決定される。

20

【 0 0 6 5 】

(ポリヌクレオチド)

その第 2 の局面において、本発明は、本発明の K R E D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列に関する。遺伝子コードの縮重を考慮すれば、本発明はまた、配列番号 4 2 、配列番号 7 2 、配列番号 7 6 、配列番号 9 6 、配列番号 2 6 2 、配列番号 2 6 4 、配列番号 2 6 6 、配列番号 2 6 8 、配列番号 2 7 0 、配列番号 2 7 2 、配列番号 2 7 4 、配列番号 2 7 6 、配列番号 2 7 8 、配列番号 2 8 0 、配列番号 2 8 2 、配列番号 2 8 4 、配列番号 2 8 6 、配列番号 2 8 8 、配列番号 2 9 0 、配列番号 2 9 2 、配列番号 2 9 4 、配列番号 2 9 6 、配列番号 2 9 8 、配列番号 3 0 0 、配列番号 3 0 2 、配列番号 3 0 4 、配列番号 3 0 6 、配列番号 3 0 8 、配列番号 3 1 0 、配列番号 3 1 2 、配列番号 3 1 4 、配列番号 3 1 6 、配列番号 3 1 8 、配列番号 3 2 0 、配列番号 3 2 2 、配列番号 3 2 4 、配列番号 3 2 6 、配列番号 3 2 8 、配列番号 3 3 0 、配列番号 3 4 4 、配列番号 3 3 2 、配列番号 3 3 4 、配列番号 3 3 6 、配列番号 3 3 8 、配列番号 3 4 0 、配列番号 3 4 2 、配列番号 3 5 4 、配列番号 3 5 8 、配列番号 3 6 0 、配列番号 3 6 4 、配列番号 3 6 8 、配列番号 3 7 4 、配列番号 3 8 2 、配列番号 3 8 6 、配列番号 3 8 8 、配列番号 3 9 8 、配列番号 4 0 0 、配列番号 4 0 8 、配列番号 4 3 8 、配列番号 4 4 0 、配列番号 4 4 8 、配列番号 4 7 0 、配列番号 4 8 4 、配列番号 4 8 6 、配列番号 4 8 8 、配列番号 4 9 0 、配列番号 5 0 2 、配列番号 5 0 6 、配列番号 5 0 8 、配列番号 5 1 2 、配列番号 5 1 4 、配列番号 5 1 6 、配列番号 5 1 8 、配列番号 5 2 0 、配列番号 5 2 2 、配列番号 5 2 4 、配列番号 5 2 6 、配列番号 5 2 8 、配列番号 5 3 0 、配列番号 5 3 2 、配列番号 5 3 4 、配列番号 5 3 6 、配列番号 5 3 8 、配列番号 5 4 0 または配列番号 5 4 2 の K R E D ポリペプチドをコードする任意のポリヌクレオチドに関する。

30

40

【 0 0 6 6 】

好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 4 1 、配列番号 7 1 、配列番号 7 5 、配列番号 9 5 、配列番号 2 6 1 、配列番号 2 6 3 、配列番号 2 6 5 、配列番号 2 6 7 、配

50

列番号 2 6 9、配列番号 2 7 1、配列番号 2 7 3、配列番号 2 7 5、配列番号 2 7 7、配
 列番号 2 7 9、配列番号 2 8 1、配列番号 2 8 3、配列番号 2 8 5、配列番号 2 8 7、配
 列番号 2 8 9、配列番号 2 9 1、配列番号 2 9 3、配列番号 2 9 5、配列番号 2 9 7、配
 列番号 2 9 9、配列番号 3 0 1、配列番号 3 0 3、配列番号 3 0 5、配列番号 3 0 7、配
 列番号 3 0 9、配列番号 3 1 1、配列番号 3 1 3、配列番号 3 1 5、配列番号 3 1 7、配
 列番号 3 1 9、配列番号 3 2 1、配列番号 3 2 3、配列番号 3 2 5、配列番号 3 2 7、配
 列番号 3 2 9、配列番号 3 4 3、配列番号 3 3 1、配列番号 3 3 3、配列番号 3 3 5、配
 列番号 3 3 7、配列番号 3 3 9、配列番号 3 4 1、配列番号 3 5 3、配列番号 3 5 7、配
 列番号 3 5 9、配列番号 3 6 3、配列番号 3 6 7、配列番号 3 7 3、配列番号 3 8 1、配
 列番号 3 8 5、配列番号 3 8 7、配列番号 3 9 7、配列番号 3 9 9、配列番号 4 0 7、配
 列番号 4 3 7、配列番号 4 3 9、配列番号 4 4 7、配列番号 4 6 9、配列番号 4 8 3、配
 列番号 4 8 5、配列番号 4 8 7、配列番号 4 8 9、配列番号 5 0 1、配列番号 5 0 5、配
 列番号 5 0 7、配列番号 5 1 1、配列番号 5 1 3、配列番号 5 1 5、配列番号 5 1 7、配
 列番号 5 1 9、配列番号 5 2 1、配列番号 5 2 3、配列番号 5 2 5、配列番号 5 2 7、配
 列番号 5 2 9、配列番号 5 3 1、配列番号 5 3 3、配列番号 5 3 5、配列番号 5 3 7、配
 列番号 5 3 9 または配列番号 5 4 1 のポリヌクレオチドに関し、これらのポリヌクレオチ
 ドは、それぞれ、配列番号 4 2、配列番号 7 2、配列番号 7 6、配列番号 9 6、配列番号
 2 6 2、配列番号 2 6 4、配列番号 2 6 6、配列番号 2 6 8、配列番号 2 7 0、配列番号
 2 7 2、配列番号 2 7 4、配列番号 2 7 6、配列番号 2 7 8、配列番号 2 8 0、配列番号
 2 8 2、配列番号 2 8 4、配列番号 2 8 6、配列番号 2 8 8、配列番号 2 9 0、配列番号
 2 9 2、配列番号 2 9 4、配列番号 2 9 6、配列番号 2 9 8、配列番号 3 0 0、配列番号
 3 0 2、配列番号 3 0 4、配列番号 3 0 6、配列番号 3 0 8、配列番号 3 1 0、配列番号
 3 1 2、配列番号 3 1 4、配列番号 3 1 6、配列番号 3 1 8、配列番号 3 2 0、配列番号
 3 2 2、配列番号 3 2 4、配列番号 3 2 6、配列番号 3 2 8、配列番号 3 3 0、配列番号
 3 4 4、配列番号 3 3 2、配列番号 3 3 4、配列番号 3 3 6、配列番号 3 3 8、配列番号
 3 4 0、配列番号 3 4 2、配列番号 3 5 4、配列番号 3 5 8、配列番号 3 6 0、配列番号
 3 6 4、配列番号 3 6 8、配列番号 3 7 4、配列番号 3 8 2、配列番号 3 8 6、配列番号
 3 8 8、配列番号 3 9 8、配列番号 4 0 0、配列番号 4 0 8、配列番号 4 3 8、配列番号
 4 4 0、配列番号 4 4 8、配列番号 4 7 0、配列番号 4 8 4、配列番号 4 8 6、配列番号
 4 8 8、配列番号 4 9 0、配列番号 5 0 2、配列番号 5 0 6、配列番号 5 0 8、配列番号
 5 1 2、配列番号 5 1 4、配列番号 5 1 8、配列番号 5 2 0、配列番号 5 2 2、配列番号
 5 2 4、配列番号 5 2 6、配列番号 5 2 8、配列番号 5 3 0、配列番号 5 3 2、配列番号
 5 3 4、配列番号 5 3 6、配列番号 5 3 8、配列番号 5 4 0 または配列番号 5 4 2 の新規
 K R E D ポリペプチドをコードする。

【0067】

特に好ましい実施形態において、本発明は、配列番号 2 5 4 のポリペプチドをコードす
 る配列番号 2 5 3 のポリヌクレオチドならびに配列番号 3 0 3 および配列番号 3 4 3 のコ
 ドン最適化ポリヌクレオチドに関し、これらの最適化ポリヌクレオチドは、E . c o l i
 における配列番号 2 5 4 のポリペプチドの増強された発現を提供する非表現突然変異を含
 む。特に、配列番号 2 5 3 から配列番号 3 4 3 へと移るコドン最適化は、以下の非表現置
 換からなっていた：A 1 6 T、G 1 7 C、C 3 0 T、T 3 3 9 A、C 6 0 0 T、T 7 3 8
 C および T 7 4 4 C。これらの非表現置換は、上記細胞溶解産物から（例えば、実施例 3
 ）その K R E D 活性によって測定される場合（例えば、実施例 4）の、上記 K R E D ポリ
 ペプチドの発現の 2 . 5 倍の増強をもたらした。

【0068】

本発明の改善された K R E D ポリヌクレオチドおよび改善された K R E D ポリペプチド
 を作製するには、骨格として使用するために K R E D ポリペプチドをコードする 1 つ以上
 の野生型ポリヌクレオチドを用いて開始する。ポリヌクレオチドに対して適用される場合
 、用語「野生型」とは、その核酸フラグメントが天然から単離された形態からのいずれの
 変異も含まないことを意味する。ポリペプチド（またはタンパク質）に対して適用される

場合、上記用語「野生型」とは、そのタンパク質が天然に見られる活性レベルで活性であることを意味し、代表的には、天然に見られるアミノ酸配列を含む。従って、上記用語「野生型」または「親配列」は、本発明の操作前の開始配列または参照配列を示す。

【0069】

改善されるべき出発物質としての天然に生じるKREDの適切な供給源は、本明細書中に記載されるKRED活性に対して生物のゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、容易に同定される。例えば、実施例4を参照のこと。天然に生じるKRED酵素は、広範囲の細菌および酵母（例えば、*Candida magnoliae* (Genbank登録番号 JC7338; GI:11360538)、*Candida parapsilosis* (Genbank登録番号 BAA24528.1; GI:2815409)、*Sporobolomyces salmicolor* (Genbank登録番号 AF160799; GI:6539734)）において見られる。KREDの特に適切な供給源は、*Candida magnoliae*である。本発明において、*Candida magnoliae*の野生型KREDポリペプチドをコードする親ポリヌクレオチド配列は、Genbank登録番号 JC7338として公開されている*Candida magnoliae*由来のKREDに対する公知のポリペプチド配列に基づいて、60マーのオリゴマーから構築された。上記親ポリヌクレオチド配列は、CR2-5（配列番号1）と呼ばれ、*E. coli*における発現のために最適化されたコドンであり、従って、上記野生型ポリヌクレオチド配列とは実質的に異なっていた。上記コドン最適化ポリヌクレオチドは、*lac*プロモーター遺伝子および*lacI*リプレッサー遺伝子の制御下にある上記発現ベクターpCK110900（図3に示される）のSfiIクローニング部位にクローニングされた。上記発現ベクターはまた、P15A複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含んだ。いくつかのクロンは、*E. coli* W3110において活性なケトレダクターゼを発現することが見出され、そしてその遺伝子は、配列決定されてそれらのDNA配列が確かめられた。CR2-5と呼ばれる配列（配列番号1）は、全ての実験およびライブラリー構築のための開始点として利用される親配列であった。

【0070】

一旦、適切な出発物質（例えば、配列番号1のポリヌクレオチド）が同定されると、未知のKRED活性を有する、天然に生じずかつ変異および/または進化された酵素は、周知の変異誘発または直接的な進化的方法のうちのいずれか1つを用いて、容易に生成される。例えば、Lingら、「Approaches to DNA mutagenesis: an overview」、*Anal. Biochem.*、254(2):157-78(1997); Daleら、「Oligonucleotide-directed random mutagenesis using the phosphorothioate method」、*Methods Mol. Biol.*、57:369-74(1996); Smith、「In vitro mutagenesis」、*Ann. Rev. Genet.*、19:423-462(1985); Botsteinら、「Strategies and applications of in vitro mutagenesis」、*Science*、229:1193-1201(1985); Carter、「Site-directed mutagenesis」、*Biochem. J.*、237:1-7(1986); Kramerら、「Point Mismatch Repair」、*Cell*、38:879-887(1984); Wellsら、「Cassette mutagenesis: an efficient method for generation of multiple mutations at defined sites」、*Gene*、34:315-323(1985); Minshullら、「Protein evolution by molecular breeding」、*Current Opinion in Chemical Biology*、3:284-290(1999); Christiansら、「Directed evolution of thymidine kinase f

or AZT phosphorylation using DNA family shuffling」、Nature Biotechnology、17:259-264(1999);Cramerら、「DNA shuffling of a family of genes from diverse species accelerates directed evolution」、Nature、391:288-291;Cramerら、「Molecular evolution of an arsenate detoxification pathway by DNA shuffling」、Nature Biotechnology、15:436-438(1997);Zhangら、「Directed evolution of an effective fructosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening」、Proceedings of the National Academy of Sciences、U.S.A.、94:45-4-4509;Cramerら、「Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling」、Nature Biotechnology、14:315-319(1996);Stemmer、「Rapid evolution of protein in vitro by DNA shuffling」、Nature、370:389-391(1994);Stemmer、「DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: In vitro recombination for molecular evolution」、Proceedings of the National Academy of Sciences、U.S.A.、91:10747-10751(1994);WO 95/22625;WO 97/0078;WO 97/35966;WO 98/27230;WO 00/42651;WO 01/75767および2003年3月25日にArnoldらに対して発行され、「Method for creating polynucleotide and polypeptide sequence」と題された米国特許第6,537,746号を参照のこと。

【0071】

これらの方法のいずれもが、KREDポリヌクレオチドを生成するために適用され得る。多様性を最大にするために、上に記載される技術のうちのいくつかは、連続的に使用され得る。代表的には、シャッフリング(shuffling)されたポリヌクレオチドのライブラリーは、1つの変異誘発技術もしくは発展的技術によって作製され、そしてそれらの発現産物は、最も高いKRED活性を有するポリペプチドを見つけるためにスクリーニングされる。本発明において、配列番号75を有するポリヌクレオチドは、補因子としてNADHを用いたスクリーニングされたライブラリー由来の最も期待できる候補であった。しかし、上記ポリペプチドの図3のプラスミドpCK110900からのより良好な発現を得るために、配列番号75のポリヌクレオチドは、E.coliにおける発現のために最適化されたコドンであるオリゴマーを用いて再合成された。得られたコドン最適化ポリヌクレオチドは、配列番号77の配列を有していた。

【0072】

それ以降、第2の変異誘発技術または進化的技術は、第2のライブラリーを作製するために配列番号77のコドン最適化ポリヌクレオチドに対して適用され、この第2のライブラリーは、次いで、同じ技術によってKRED活性に対してスクリーニングされた。得られたクローンをスクリーニングすることは、3つのクローン、配列番号123、配列番号203および配列番号223の単離をもたらし、これらのクローンは、それぞれ、配列番号124、配列番号204および配列番号224のKREDポリペプチドをコードし、NADH(配列番号124)またはNADPH(配列番号204および配列番号224)を補因子として使用すると、配列番号2の野生型ポリペプチドの3.1倍と4.3倍との間のKRED活性を有する。変異させ、そしてスクリーニングするプロセスは、所望される

活性、熱安定性および補因子選択性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに達するまで、必要とされるだけ多くの回数反復され得、このプロセスは、点変異の挿入を含む。

【0073】

図3のプラスミドpCK110900からの配列番号123のポリヌクレオチドのより良好な発現を得るために、配列番号123のポリペプチドは、上記ベクターのSfiI部位および上記KRED mRNAの5'末端でRNAヘアピンループ形成を導き得るヌクレオチドを置換するために、オリゴマーを用いて再増幅された。具体的には、オリゴは、上記pCK110900ベクターの5'-SfiI部位を変化させ、そしてコードKREDポリペプチドの6位の残基におけるセリンのためのAGCコドン、セリンをまたコードしたTCCコドンで置換することにより、これらの潜在的なステムループ構造を阻害するように設計された。得られたコドン最適化ポリヌクレオチドは、その形質転換および培養された宿主細胞の溶解産物におけるKRED活性により測定される場合、上記KREDポリペプチドの約2と2分の1(2.5)倍高い発現をもたらした。

10

【0074】

補因子としてNADPHを用いて第3ラウンドライブラリーをスクリーニングした後、配列番号253を有するポリヌクレオチドは、最も期待できる候補であった。しかし、図3のpCK110900プラスミドからの上記ポリヌクレオチドのより良好な発現を得るために、上記配列番号253のポリヌクレオチドは、進化した技術を適用することによってさらに改善され、そして上記配列番号123についてと同様に、ヘアピン形成ヌクレオチドが除去されたベクター中で、クローニングされた。得られたコドン最適化ポリヌクレオチドは、配列番号303および配列番号343のポリヌクレオチドを含んでいた。

20

【0075】

シャッフル技術または進化した技術を適用する代わりに、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、公知の合成方法に従う標準的な固相方法によって調製され得る。代表的には、約100塩基までのフラグメントは、独立して合成され、次いで(例えば、酵素的もしくは化学的なライゲーション方法またはポリメラーゼ媒介性方法によって)結合されて、本質的に、任意の所望される連続配列を形成する。例えば、本発明のポリヌクレオチドおよびオリゴヌクレオチドは、例えば、自動合成方法において代表的に実施される場合、例えば、Beaucageら(1981)Tetrahedron Letters 22:1859-69により記載される古典的なホスホロアミダイト方法またはMatthesら(1984)EMBO J. 3:801-05により記載される方法(例えば、自動合成法において代表的に実施されるような方法)を用いて、化学合成によって調製され得る。上記ホスホロアミダイト方法に従って、オリゴヌクレオチドは、例えば、自動DNA合成機において合成され、精製され、アニールされ、連結され、そして適切なベクター中にクローニングされる。さらに、本質的に、任意の核酸は、任意の種々の市販供給源(例えば、The Midland Certified Reagent Company、Midland、TX、The Great American Gene Company、Ramona、CA、Express Gen Inc. Chicago、IL、Operon Technologies Inc.、Alameda、CAおよび他の多くの市販供給源)から特別注文され得る。

30

40

【0076】

(核酸構築物/発現カセット/発現ベクター)

別の局面において、本発明は、核酸構築物に関し、この核酸構築物は、核酸構築物を生じるために遺伝子発現を制御する1つ以上の異種調節配列に作動可能に連結された、本発明のKREDポリペプチドをコードするポリヌクレオチド(例えば、発現ベクターまたは発現カセット)を含む。その後、得られた核酸構築物(例えば、発現ベクターまたは発現カセット)は、上記ポリヌクレオチド改変体によりコードされたKREDポリペプチドの究極的な発現のために、適切な宿主細胞に挿入された。

【0077】

50

「核酸構築物」は、一本鎖または二本鎖のいずれかの核酸分子として本明細書中で規定され、天然に存在する遺伝子から単離されるかまたは改変されて、そうでなければ天然に存在しない様式で組み合わせられ、かつ並列される核酸のセグメントを含む。上記用語、核酸構築物は、その核酸構築物が、本発明のコード配列（ポリヌクレオチド）の発現のために必要とされる全ての制御配列を含む場合、用語、発現カセットまたは発現ベクターを含む。

【0078】

用語「コード配列」は、そのタンパク質産物のアミノ酸配列を直接特定するポリヌクレオチド配列として、本明細書中で規定される。ゲノムコード配列の境界は、一般的に、そのmRNAの5'末端のオープンリーディングフレームのすぐ上流に位置するリボソーム結合部位（原核生物）またはATG開始コドン（真核生物）、およびそのmRNAの3'末端のオープンリーディングフレームのすぐ下流に位置する転写終結配列によって決定される。コード配列としては、DNA、cDNAおよび組み換え核酸配列が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0079】

本発明のKREDポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドは、種々の方法で操作されて、そのポリペプチドの発現を提供し得る。上記単離されたポリヌクレオチドのそのベクターへの挿入前の操作は、その発現ベクターに依存して、所望され得るかまたは必要とされ得る。組み換えDNA法を利用してポリペプチドおよび核酸配列を改変するための技術は、当該分野において周知である。

20

【0080】

用語「制御配列」は、本発明のポリペプチドの発現のために必要かまたは有利な全ての構成要素を含むことが、本明細書中で規定される。各制御配列は、上記ポリペプチドをコードする核酸配列に対してネイティブであっても外来性であってもよい。このような制御配列としては、リーダー、ポリアデニル化配列、プロペプチド配列、プロモーター、シグナルペプチド配列および転写ターミネーターが挙げられるが、これらに限定されない。最低でも、上記制御配列は、プロモーターならびに転写停止シグナルおよび翻訳停止シグナルを含む。上記制御配列は、その制御配列とポリペプチドをコードする核酸配列のコード領域とのライゲーションを容易にする特定の制限部位を導入する目的のために、リンカーが提供され得る。

30

【0081】

用語「作動可能に連結された」は、制御配列が、上記DNA配列のコード配列に対する位置に適切に位置され、それにより、その制御配列がポリペプチドを発現させる配置として、本明細書中で規定される。

【0082】

上記制御配列は、適切なプロモーター配列であり得る。上記「プロモーター配列」は、それに続くより長いコード領域の発現のために宿主細胞によって認識される、比較的短い核酸配列である。上記プロモーター配列は、上記ポリペプチドの発現を媒介する転写制御配列を含む。上記プロモーターは、選択された宿主細胞において転写活性を示す任意の核酸配列であり得、これらの核酸配列としては、変異プロモーター、トランケートプロモーターおよびハイブリッドプロモーターが挙げられ、そしてこれらの核酸配列は、その宿主細胞に対して相同性または異種性のいずれかの細胞外ポリペプチドまたは細胞内ポリペプチドをコードする遺伝子から得られ得る。

40

【0083】

細菌宿主細胞のために、本発明の核酸構築物を転写させるために適切なプロモーターとしては、*E. coli* lacオペロン、*Streptomyces coelicolor* アガラーゼ遺伝子 (dagA)、*Bacillus subtilis* レバンスクラーゼ遺伝子 (sacB)、*Bacillus licheniformis* アミラーゼ遺伝子 (amyL)、*Bacillus stearothermophilus* マルトース生成アミラーゼ遺伝子 (amyM)、*Bacillus amylolique*

50

faciens アミラーゼ遺伝子 (amyQ)、Bacillus licheniformis ペニシリナーゼ遺伝子 (penP)、Bacillus subtilis xylA 遺伝子および xylB 遺伝子ならびに原核生物 ラクタマーゼ遺伝子 (Villa-Kamaroff ら、1978、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:3727-3731) から得られるプロモーターならびに tac プロモーター (DeBoer ら、1983、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 80:21-25) が挙げられる。さらなるプロモーターは、「Useful proteins from recombinant bacteria」Scientific American、1980、242:74-94 ; および Sambrook ら、1989、前出に記載されている。 10

【0084】

糸状菌宿主細胞のために、本発明の核酸構築物を転写させるために適切なプロモーターとしては、Aspergillus oryzae TAKA アミラーゼ、Rhizomucor miehei アスパラギン酸プロテアーゼ、Aspergillus niger 天然 アミラーゼ、Aspergillus niger 酸安定 アミラーゼ、Aspergillus niger または Aspergillus awamori グルコアミラーゼ (glaA)、Rhizomucor miehei リパーゼ、Aspergillus oryzae アルカリプロテアーゼ、Aspergillus oryzae トリオースホスフェートイソメラーゼ、Aspergillus nidulans アセトアミダーゼおよび Fusarium oxysporum チロシン様プロテアーゼ (WO 96/00787) の遺伝子から得られるプロモーターならびに NA2-tpi プロモーター (Aspergillus niger 天然 アミラーゼの遺伝子由来のプロモーターと Aspergillus oryzae トリオースホスフェートイソメラーゼの遺伝子由来のプロモーターとのハイブリッド)、ならびにそれらの変異プロモーター、トランケートプロモーターおよびハイブリッドプロモーターが挙げられる。 20

【0085】

酵母宿主において、有用なプロモーターは、Saccharomyces cerevisiae エノラーゼ (ENO-1)、Saccharomyces cerevisiae ガラクトキナーゼ (GAL1)、Saccharomyces cerevisiae アルコールデヒドロゲナーゼ / グリセロアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2 / GAP) および Saccharomyces cerevisiae 3-ホスホグリセラーゼキナーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための他の有用なプロモーターは、Romanos ら、1992、Yeast 8:423-488 に記載されている。 30

【0086】

上記制御配列はまた、適切な転写終結配列 (宿主細胞によって認識されて転写を終結する配列) であり得る。上記終結配列は、上記ポリペプチドをコードする核酸配列の 3' 末端に作動可能に連結される。選択された宿主細胞において機能的である任意のターミネーターは、本発明において使用され得る。 40

【0087】

糸状菌宿主細胞のために好ましいターミネーターは、Aspergillus oryzae TAKA アミラーゼ、Aspergillus niger グルコアミラーゼ、Aspergillus nidulans アントラニレートシンターゼ、Aspergillus niger グルコシダーゼおよび Fusarium oxysporum チロシン様プロテアーゼの遺伝子から得られる。

【0088】

酵母宿主細胞のための好ましいターミネーターは、Saccharomyces cerevisiae エノラーゼ、Saccharomyces cerevisiae 3-ホスホグリセラーゼキナーゼの遺伝子から得られる。 50

シトクロム C (CYC1) および *Saccharomyces cerevisiae* グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための他の有用なターミネーターは、Romanosら、1992、前出に記載されている。

【0089】

上記制御配列はまた、適切なリーダー配列（上記宿主細胞による翻訳のために重要な、mRNAの非翻訳領域）であり得る。上記リーダー配列は、上記ペプチドをコードする核酸配列の5'末端に作動可能に連結される。選択された宿主細胞において機能的である任意のリーダー配列は、本発明において使用され得る。糸状菌宿主細胞のための好ましいリーダーは、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼおよび *Aspergillus nidulans* トリオースホスフェートイソメラーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための適切なリーダーは、*Saccharomyces cerevisiae* エノラーゼ (ENO-1)、*Saccharomyces cerevisiae* 3-ホスホグリセラーゼキナーゼ、*Saccharomyces cerevisiae* 因子および *Saccharomyces cerevisiae* アルコールデヒドロゲナーゼ/グリセロアルデヒド - 3 - リン酸デヒドロゲナーゼ (ADH2 / GAP) の遺伝子から得られる。

10

【0090】

上記制御配列はまた、ポリアデニル化配列（上記核酸配列の3'末端に作動可能に連結され、そして転写される際に上記宿主細胞によってシグナルとして認識されて、転写されたmRNAにポリアデノシン残基を付加する配列）であり得る。選択された宿主細胞において機能的である任意のポリアデニル化配列は、本発明において使用され得る。糸状菌宿主細胞のための好ましいポリアデニル化配列は、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Aspergillus nidulans* アントラニレートシンターゼ、*Fusarium oxysporum* チロシン様プロテアーゼおよび *Aspergillus niger* グルコシダーゼの遺伝子から得られる。酵母宿主細胞のための有用なポリアデニル化配列は、GuoおよびSherman、1995、*Molecular Cellular Biology* 15: 5983 - 5990に記載されている。

20

【0091】

上記制御配列はまた、ポリペプチドのアミノ末端に連結され、そしてその制御配列がコードされたポリペプチドをその細胞の分泌経路に向けるアミノ酸配列をコードする、シグナルペプチドコード領域であり得る。上記核酸配列のコード配列の5'末端は、本来、シグナルペプチドコード領域を含み得、このシグナルペプチドコード領域は、翻訳リーディングフレームにおいて、その分泌ポリペプチドをコードするコード領域のセグメントと、天然に連結されている。あるいは、上記コード配列の5'末端は、そのコード配列に対して外来性であるシグナルペプチドコード領域を含み得る。上記外来性シグナルペプチドコード領域は、そのコード配列がシグナルペプチドコード領域を天然に含まない場合に、必要とされ得る。

30

【0092】

あるいは、上記外来性シグナルペプチドコード領域は、そのポリペプチドの分泌を促進するために、その天然シグナルペプチドコード領域を、単に置換し得る。しかし、その発現ポリペプチドを選択された宿主細胞の分泌経路に向ける任意のシグナルペプチドコード領域が、本発明において使用され得る。

40

【0093】

細菌宿主細胞のために有効なシグナルペプチドコード領域は、*Bacillus NC1B 11837* マルトース生成アミラーゼ、*Bacillus stearothermophilus* アミラーゼ、*Bacillus licheniformis* サブチリシン、*Bacillus licheniformis* ラクタマーゼ、*Bacillus stearothermophilus* 中性プロテアーゼ (nprT、n

50

prS、nprM)および*Bacillus subtilis* prsAの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。さらなるシグナルペプチドは、SimonenおよびPalva、1993、*Microbiological Reviews* 57:109-137に記載されている。

【0094】

糸状菌宿主細胞のための有効なシグナルペプチドコード領域は、*Aspergillus oryzae* TAKAアミラーゼ、*Aspergillus niger* 中性アミラーゼ、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼ、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテアーゼ、*Humicola insolens* セルラーゼおよび*Humicola lanuginosa* リパーゼの遺伝子から得られるシグナルペプチドコード領域である。

10

【0095】

酵母宿主細胞のための有用なシグナルペプチドは、*Saccharomyces cerevisiae* 因子および*Saccharomyces cerevisiae* インベルターゼの遺伝子から得られる。他の有用なシグナルペプチドコード領域は、Romanosら、1992、前出に記載されている。

【0096】

上記制御配列はまた、ポリペプチドのアミノ末端に位置するアミノ酸配列をコードするプロペプチドコード領域であり得る。得られたポリペプチドは、プロ酵素またはプロポリペプチド(またはいくつかの場合、チモーゲン)として公知である。プロポリペプチドは、一般的に不活性であり、そしてそのプロポリペプチドからそのプロペプチドの触媒的切断または自己触媒的切断によって、成熟活性ポリペプチドに変換され得る。上記プロペプチドコード領域は、*Bacillus subtilis* アルカリプロテアーゼ(aprE)、*Bacillus subtilis* 中性プロテアーゼ(nprT)、*Saccharomyces cerevisiae* 因子、*Rhizomucor miehei* アスパラギン酸プロテアーゼおよび*Myceliophthora thermophila* ラクターゼ(WO 95/33836)の遺伝子から得られる。

20

【0097】

シグナルペプチド領域およびプロペプチド領域の両方がポリペプチドのアミノ末端に存在する場合、そのプロペプチド領域は、ポリペプチドのアミノ末端の次に位置し、そしてそのシグナルペプチド領域は、そのプロペプチド領域のアミノ末端の次に位置する。

30

【0098】

調節配列を付加することがまた、所望され得、この調節配列は、上記宿主細胞の増殖に対する上記ポリペプチドの発現の調節を可能にする。調節系の例は、化学的または生理的刺激に応答してスイッチを入れられるかまたはスイッチを消されるべき遺伝子の発現を引き起こす調節系であり、これらの刺激としては、調節化合物の存在が挙げられる。原核生物宿主細胞において、適切な調節配列としては、lacオペレーター系、tacオペレーター系およびtrpオペレーター系が挙げられる。酵母宿主細胞において、適切な調節系としては、ADH2系またはGAL1系が挙げられる。糸状菌において、適切な調節配列としては、TAKAアミラーゼプロモーター、*Aspergillus niger* グルコアミラーゼプロモーターおよび*Aspergillus oryzae* グルコアミラーゼプロモーターが挙げられる。

40

【0099】

調節配列の他の例は、遺伝子増幅を可能にする調節配列である。真核生物系において、これらとしては、メトトレキサートの存在下で増幅されるジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子および重金属によって増幅されるメタロチオネイン遺伝子が挙げられる。これらの場合、本発明のKREDポリペプチドをコードする核酸配列は、上記調節配列に作動可能に連結される。

【0100】

従って、別の局面において、本発明はまた、組み換え発現ベクターに関し、この組み換

50

え発現ベクターは、それらが導入されるべき宿主の型に依存して、（本発明のK R E Dポリペプチドをコードする）本発明のポリヌクレオチド、および1つ以上の発現調節領域（例えば、プロモーターおよびターミネーター）、複製起点などを含む。上に記載される種々の核酸配列および制御配列は、一緒に結合されて組み換え発現ベクターを生成し得、この組み換え発現ベクターは、1つ以上の都合のよい制限部位を含み得、このような部位において上記ポリペプチドをコードする核酸配列の挿入または置換を可能にし得る。あるいは、本発明の核酸配列は、上記配列を含む核酸配列または核酸構築物を、発現のための適切なベクターに挿入することによって、発現され得る。上記発現ベクターの作製において、上記コード配列は、そのベクター中に位置し、それにより、そのコード配列は、発現のための適切な制御配列と作動可能に連結される。

10

【0101】

上記組み換え発現ベクターは、任意のベクター（例えば、プラスミドまたはウイルス）であり得、これらのベクターは、組み換えDNA手順に都合よく供され得、そして上記ポリペプチド配列の発現をもたらし得る。上記ベクターの選択は、代表的に、そのベクターと、そのベクターが導入されるべき宿主細胞との適合性に依存する。上記ベクターは、直線状でも閉じられた環状プラスミドでもよい。

【0102】

上記発現ベクターは、自己複製ベクター（すなわち、染色体外存在物として存在し、その複製は、染色体の複製に依存しないベクター）（例えば、プラスミド）であっても、染色体外エレメントであっても、ミニ染色体（*minichromosome*）であっても、人工染色体であってもよい。上記ベクターは、自己複製を保証するための任意の手段を含み得る。あるいは、上記ベクターは、上記宿主細胞に導入されると、そのゲノムに統合され、そしてそのベクターが統合された染色体と一緒に複製されるベクターであり得る。さらに、上記宿主細胞のゲノムに導入されるべきDNA全体と一緒に含む、単一のベクターもしくはプラスミドまたは2つ以上のベクターもしくはプラスミド、あるいはトランスポゾンが、使用され得る。

20

【0103】

本発明の発現ベクターは、好ましくは、形質転換細胞の選択を容易にする1つ以上の選択マーカーを含む。選択マーカーは、その選択マーカーの産物が、バイオサイド耐性またはウイルス耐性、重金属に対する耐性、栄養素要求株に対する原栄養菌などを提供する遺伝子である。細菌選択マーカーの例は、*Bacillus subtilis*もしくは*Bacillus licheniformis*由来の*dal*遺伝子または抗生物質耐性（例えば、アンピシリン耐性、カナマイシン耐性、クロラムフェニコール耐性（実施例1）またはテトラサイクリン耐性）を与えるマーカーである。酵母宿主細胞のための適切なマーカーは、*ADE2*、*HIS3*、*LEU2*、*LYS2*、*MET3*、*TRP1*および*URA3*である。

30

【0104】

糸状菌宿主細胞における使用のための選択マーカーとしては、*amdS*（アセトアミダーゼ）、*argB*（オルニチンカルバモイルトランスフェラーゼ）、*bar*（ホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼ）、*hph*（ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ）、*niaD*（硝酸レダクターゼ）、*pyrG*（オロチジン-5'-リン酸デカルボキシラーゼ）、*sC*（硫酸アデニルトランスフェラーゼ）および*trpC*（アントラニル酸シンターゼ）ならびにそれらの等価物が挙げられるが、これらに限定されない。*Aspergillus*細胞における使用のためには、*Aspergillus nidulans*または*Aspergillus oryzae*の*amdS*遺伝子および*pyrG*遺伝子ならびに*Streptomyces hygroscopicus*の*bar*遺伝子が好ましい。

40

【0105】

本発明の発現ベクターは、好ましくは、そのベクターの上記宿主細胞のゲノムへの統合またはそのゲノムに非依存的なその細胞におけるそのベクターの自己複製を許容するエレ

50

メントを含む。上記宿主細胞ゲノムへの統合のために、上記ベクターは、相同組み換えまたは非相同組み換えによるそのベクターのゲノムへの統合のために、上記ポリプチドまたはそのベクターの任意の他のエレメントをコードする核酸配列に頼り得る。

【0106】

あるいは、上記発現ベクターは、相同組み換えによって上記宿主細胞のゲノムに統合させるためのさらなる核酸配列を含み得る。上記さらなる核酸配列は、上記ベクターが、染色体における正確な位置で上記宿主細胞ゲノムに統合されることを可能にする。正確な位置での統合の可能性を上昇するために、上記統合エレメントは、好ましくは、十分な数の核酸（例えば、100塩基対～10,000塩基対、好ましくは、400塩基対～10,000塩基対、そして最も好ましくは、800塩基対～10,000塩基対）を含むべきであり、これらの核酸は、対応する標的配列と高度に相同性であって、相同組み換えの可能性を上昇させる。上記統合エレメントは、上記宿主細胞のゲノムにおける標的配列と同種である、任意の配列であり得る。さらに、上記統合エレメントは、非コード核酸配列であってもコード核酸配列であってもよい。一方、上記ベクターは、非相同組み換えによって上記宿主細胞のゲノム中に統合され得る。

10

【0107】

自己複製のために、上記ベクターは、そのベクターが問題となる宿主細胞において自律的に複製することを可能にする複製起点をさらに含み得る。細菌複製起点の例は、（図3のプラスミドにおいて示されるような）P15A oriまたはプラスミドpBR322、pUC19、pACYC177（プラスミドは、P15A oriを有する）もしくはE. coliにおける複製を許容するpACYC184およびBacillusにおける複製を許容するpUB110、pE194、pTA1060もしくはpAM. 1の複製起点である。酵母宿主細胞における使用のための複製起点の例は、2micron複製起点、ARS1、ARS4、ARS1とCEN3との組み合わせおよびARS4とCEN6との組み合わせである。上記複製起点は、上記宿主細胞においてその複製起点の機能を温度感受性にする変異を有する複製起点であり得る（例えば、Ehrlich、1978、Proceedings of the National Academy of Sciences USA 75:1433を参照のこと）。

20

【0108】

本発明の核酸配列の1つより多くのコピーは、上記宿主細胞に挿入されて、その遺伝子産物の生成を増大させる。上記核酸配列のコピー数の上昇は、その配列の少なくとも1つのさらなるコピーを上記宿主細胞のゲノムに統合することによるか、またはその核酸配列とともに増幅可能選択マーカー遺伝子を含むことによって得られ得、増幅可能選択マーカー遺伝子を含む場合、その選択マーカー遺伝子の増幅されたコピーを含み、それにより、その核酸配列のさらなるコピーを含む細胞が、適切な選択因子の存在下でその細胞を培養することにより選択され得る。

30

【0109】

上に記載されたエレメントを連結するために使用されて、本発明の組み換え核酸構築物および発現ベクターを構築する手順は、当業者に周知である（例えば、J. Sambrook、E. F. FritschおよびT. Maniatis、1989、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor、N.Y.を参照のこと）。

40

【0110】

本発明における使用のための発現ベクターの多くは、市販される。適切な市販発現ベクターとしては、Sigma-Aldrich Chemicals、St. Louis MO.からのp3xFLAGTMTM発現ベクターが挙げられ、この発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞における発現のためのCMVプロモーターおよびhGHポリアデニル化部位ならびにpBR322複製起点およびE. coliにおける増幅のためのアンピシリン耐性マーカーを含む。他の適切な発現ベクターは、Stratagene、La Jolla CAから市販されるpBluescriptII SK(-)およびpBK-CMV

50

ならびに pBR322 (Gibco BRL)、pUC (Gibco BRL)、pREP4、pCEP4 (Invitrogen) または pPoly (Lathe ら、1987、Gene 57、193-201) に由来するプラスミドである。

【0111】

(宿主細胞)

別の局面において、本発明は、本発明の KRED ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞に関し、このポリヌクレオチドは、その宿主細胞におけるその KRED ポリペプチドの発現のために、1つ以上の制御配列に作動可能に連結される。本発明の発現ベクターによってコードされる上記 KRED ポリペプチドの発現における使用のための宿主細胞は、当該分野において周知であり、細菌細胞 (例えば、E. coli 細胞、Streptomyces 細胞および Salmonella typhimurium 細胞); 真菌細胞 (例えば、酵母細胞 (例えば、Saccharomyces cerevisiae または Pichia pastoris (ATCC 登録番号 201178))) ; 昆虫細胞 (例えば、Drosophila S2 細胞および Spodoptera Sf9 細胞); 動物細胞 (例えば、CHO 細胞、CS 細胞、293 細胞および Bowes 黒色腫細胞); および植物細胞が挙げられるが、これらに限定されない。上に記載される宿主細胞のための適切な培養培地および培養条件は、当該分野において周知である。

10

【0112】

例として、Escherichia coli W3110 を、本発明のポリヌクレオチド改変体を発現するための発現ベクターによって形質転換した。上記発現ベクターを、本発明の KRED ポリヌクレオチド改変体をプラスミド pCK110900 に作動可能に連結することによって作製し、このプラスミド pCK110900 は、lacI リプレッサー遺伝子の制御下で lac プロモーターに作動可能に結合される。上記発現ベクターはまた、P15A 複製起点およびクロラムフェニコール耐性遺伝子を含んでいた。上記形質転換 Escherichia coli W3110 を、クロラムフェニコールを含有する適切な培養培地で培養し、それにより、その発現ベクターを発現した形質転換 E. coli 細胞のみが、生存した。例えば、実施例 1 を参照のこと。

20

【0113】

(精製)

本発明の KRED ポリペプチドが上記ポリヌクレオチド改変体によって発現されると、そのポリペプチドを、タンパク質精製のための任意の 1つ以上の周知技術 (リゾチーム処理、音波破碎、濾過、塩の適用、超遠心分離、アフィニティークロマトグラフィーなどを含む) を用いて、上記細胞および / または培養培地から精製した。細菌 (例えば、E. coli) 由来のタンパク質の溶解および高効率抽出のための適切な溶液は、St. Louis MO の Sigma-Aldrich から、商標名 Cellytic BTM で市販される。化学的プロセスにおける適用のために、細胞溶解産物から上記 KRED ポリペプチドを十分に精製するための適切なプロセスは、本明細書中の実施例 3 において開示される。

30

【0114】

(スクリーニング)

増強した KRED 活性について、上記発現ライブラリーから上記 KRED ポリペプチドのクローンをスクリーニングすることは、代表的に、NADH または NADPH が NAD⁺ または NADP⁺ に変換されるのに伴う (吸光度または蛍光の減少を介した) NADH または NADPH の減少速度をモニタリングする、標準的な生物化学的技術を用いて実施される。この反応において、上記ケトレダクターゼが、ケトン基質を対応するヒドロキシル基に立体特異的に還元するにつれて、上記 NADH または NADPH は、そのケトレダクターゼによって使い果たされる (酸化される)。単位時間あたりの NADH または NADPH の減少速度は、吸光度または蛍光の減少により測定される場合、一定量の上記溶解産物 (またはそれから作製された凍結乾燥粉末) における、上記 KRED ポリペプチドの相対 (酵素) 活性を示す。このような手順は、本明細書中の実施例 4 に記載されている。

40

50

【0115】

第1ラウンドの変異後に得られたライブラリーは、スクリーニングされて、そして最も優れたKREDポリペプチド(配列番号76)は、配列番号2のC. magnoliae KRED骨格と比較して、H67Q変異およびF158Y変異を有していた。次いで、配列番号76をコードするポリヌクレオチド配列(配列番号75)は、オリゴマーから再合成されて、E. coliにおける発現のためにコドンが最適化された。得られたコドン最適化ポリヌクレオチドは、配列番号77の配列を有していた。

【0116】

その後、第2の変異誘発技術または進化技術は、配列番号77のコドン最適化ポリヌクレオチドに適用されて、第2のライブラリーを生成し、この第2のライブラリーは、次いで、同様の技術によってKRED活性についてスクリーニングされた。得られたクローンをスクリーニングすることは、補因子としてNADPHまたはNADHのいずれかを用いて、配列番号2の野生型ポリペプチドの1.5倍と4.3倍の間のKRED活性を実証する、3つのクローンの単離をもたらした。これらのクローンは、親であるC. magnoliaeベースの配列番号2のKRED骨格と比較したそれらの変異および活性に沿って、以下の表2に列挙される。

【0117】

【表2】

表2

KRED ペプチド 番号	変異	スクリー ニングに おいて 使用され た補因子	配列番号2 のKREDと 比較した、 最初の KRED活性 のX倍の上昇	エナンチオ 選択性
配列番号 124	H67Q V140I F158Y K167I V172I M177V V184I	NADH	**	98%
配列番号 204	H67Q, V140I, F158L, M177T, V184I	NADPH	**	99.9%
配列番号 224	S42N	NADPH	**	99.9%

** =配列番号2と比較して、150%(1.5倍)を超える上昇

本発明のKREDポリヌクレオチドは、変異または進化させられてライブラリーを生成し得、このライブラリーは、スクリーニングされて、補因子(または、NADPHよりはむしろNADH)として他の化合物を選択的に受容する能力を有する、それらの改変KREDポリペプチドを同定し得る。特に、E226G変異は、NADPHからNADHへの補因子選択性における変化を引き起こすことが発見され(配列番号102、配列番号104、配列番号114、配列番号120、配列番号122、配列番号130、配列番号134、配列番号136、配列番号140、配列番号142、配列番号146、配列番号166、配列番号178、配列番号188、配列番号192、配列番号194、配列番号208および配列番号210)、E226D(配列番号128および配列番号138)およびE226K(配列番号216)についても同様であった。

【0118】

本発明のKREDポリヌクレオチドは、変異または進化させられてライブラリーを生成し得、このライブラリーは、スクリーニングされて、増強した熱安定性を有するそれらの改変KREDポリペプチドを同定し得る。特に、置換:P14A、V140I、V184

I、A194V（配列番号92、配列番号276、配列番号334、配列番号344、配列番号506、配列番号526および配列番号542）は、配列番号2のポリペプチドと比較して、増強した熱安定性を提供することが発見された。

【0119】

その後、第3ラウンドライブラリーが調製され、そして本明細書中に記載されるようにKRED活性についてスクリーニングされた。上記第3ラウンドライブラリー由来の4つのクローンは、上記第2ラウンドライブラリーの最も優れた候補の2倍の活性を有しており、これらは表3に列挙される。配列番号253を有するポリヌクレオチドは、最も期待できる候補であった。この配列番号253を有するポリヌクレオチドは、配列番号2のKRED骨格と比較して2つの変異、S42NおよびA194Vを有し、そして補因子としてNADPHを用いて、配列番号2の野生型KREDと比較して最初のKRED活性の3倍の上昇を提供する、KREDポリペプチドを発現した。

10

【0120】

【表3】

表3

KRED ペプチド 番号	変異	配列番号2 のKREDと 比較した、 最初の KRED活性 のX倍の上昇	エナンチオ選択性
配列番号 250	S42N E160G A194V	***	99.9%
配列番号 252	S42N, D95Y	***	99.9%
配列番号 254	S165N, A194V	***	99.9%
配列番号 256	S42N 140I F158L M177T V184T	***	98.3
配列番号 260	H67Q F158Y T235K	***	99.2%

20

*** = 配列番号2と比較して、300%（3倍）を超える上昇

変異プロセスおよびスクリーニングプロセスは、所望される活性、熱安定性および補因子選択性を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに達するまで、必要とされるだけ多くの回数反復され得、このプロセスは、点変異の挿入を含む。

30

【0121】

図3のプラスミドpCK110900からの上記ポリヌクレオチド（配列番号123）のより良好な発現を得るために、配列番号123のポリヌクレオチドは、オリゴマーを用いて再増幅されて、上記ベクターのSfiI部位および上記KRED mRNAの5'末端においてRNAヘアピンループ形成を導き得るヌクレオチドを置換した。具体的には、オリゴは、上記pCK110900ベクターの5'-SfiI部位を変化させ、そしてコードKREDポリペプチドの6位の残基におけるセリンのためのAGCコドン、セリンをまたコードしたTCCコドンで置換することにより、これらの潜在的なステムループ構造を阻害するように設計された。得られたコドン最適化ポリヌクレオチドは、その形質転換され、かつ培養された宿主細胞の溶解産物におけるKRED活性により測定される場合、上記KREDポリペプチドの約3倍高い発現をもたらした。第3ラウンドライブラリーのスクリーニング後、配列番号253を有するポリヌクレオチドは、最も期待できる候補であった。しかし、図3のプラスミドpCK110900からの上記ポリヌクレオチドのより良好な発現を得るために、上記配列番号253のポリヌクレオチドは、進化技術を適用することによってさらに改善され、そして上記配列番号123についてと同様に、ヘアピン形成ヌクレオチドが除去されたベクター中にクローニングされた。得られたコドン最適化ポリヌクレオチドは、配列番号303および配列番号343のポリヌクレオチドを含んでいた。

40

50

【 0 1 2 2 】

さらに、本発明の K R E D ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、発現のために選択された宿主生物からの最適な生成のために、コドンが最適化され得る。当業者は、広い範囲の生物のためのコドン選択性情報を提供する表および他の参考文献が、容易に入手可能であることを理解する。例えば、Henaut および Danchin、「Escherichia coli and Salmonella」、Neidhardt ら、編、ASM Press、Washington D.C.、p. 2047 ~ 2066 (1966) を参照のこと。

【 0 1 2 3 】

一般的に、K R E D を発現する形質転換細胞のスクリーニングは、2 工程プロセスである。第 1 に、上記細胞を物理的に分離し、次いで、どの細胞が所望の特性を保有し、そしてどの細胞が所望の特性を保有しないかを決定する。選択は、スクリーニング様式であり、この様式において、同定および物理的な分離は、選択マーカーの発現によって同時に達成され、この選択マーカーは、いくつかの遺伝的環境において、そのマーカーを発現している細胞を生存させ、他方、他の細胞は死ぬ（または逆もまた同様）。例示的なスクリーニングマーカーとしては、ルシフェラーゼ、ガラクトシダーゼおよび緑色蛍光タンパク質が挙げられる。選択マーカーとしては、薬物耐性遺伝子およびトキシン耐性遺伝子（例えば、クロラムフェニコール、アンピシリンなどに対する耐性）が挙げられる。自発的な選択は、天然の進化の過程で生じ得るかまたは生じるが、本方法においては、選択は、人間によって実施される。

【 0 1 2 4 】

本明細書中で開示される方法によって作製される K R E D ポリヌクレオチドは、実施例 4 に記載のプロトコールに従ってスクリーニングされ、本発明の改善された K R E D ポリペプチドとして包含するために適切な、増強した活性を有する K R E D ポリヌクレオチドを同定する。

【 0 1 2 5 】

以下の配列は、配列番号 2 の野生型 C . m a g n o l i a e K R E D ポリペプチド (Genbank 登録番号 J C 7 3 3 8 ; G I : 1 1 3 6 0 5 3 8 にもまた、開示される) と比較した本発明の K R E D ポリペプチド改変体の多様性を要約し、ここで、「X」として表されその後に残基番号が続く、1 つ以上のアミノ酸残基は、置換されて本発明の K R E D ポリペプチドを生じる：

【 0 1 2 6 】

【 化 9 】

X₂ X₃ N X₅ S X₇ V X₉ Y P X₁₂ X₁₃ X₁₄ P X₁₆ H X₁₈ X₁₉ X₂₀ X₂₁ X₂₂ X₂₃ X₂₄ X₂₅ L D L
F K L X₃₂ G K V X₃₆ S I T G X₄₁ X₄₂ S G X₄₅ G Y X₄₈ L A E A F A Q X₅₆ G A D X₆₀
A I W X₆₄ X₆₅ X₆₆ X₆₇ X₆₈ A T X₇₁ K A X₇₄ A L A X₇₈ X₇₉ Y G V K V X₈₅ X₈₆ Y K A
X₉₀ V S X₉₃ S X₉₅ A V X₉₈ X₉₉ X₁₀₀ X₁₀₁ E X₁₀₃ Q X₁₀₅ X₁₀₆ D F G X₁₁₀ L D I X₁₁₄ V
X₁₁₆ N A G X₁₂₀ P W T X₁₂₄ G A Y I X₁₂₉ Q X₁₃₁ X₁₃₂ D X₁₃₄ H F X₁₃₇ X₁₃₈ V X₁₄₀ D
V X₁₄₃ X₁₄₄ X₁₄₅ G X₁₄₇ G Y X₁₅₀ A K X₁₅₃ A G R X₁₅₇ X₁₅₈ X₁₅₉ X₁₆₀ R X₁₆₂ X₁₆₃
X₁₆₄ X₁₆₅ G X₁₆₇ K G X₁₇₀ L X₁₇₂ X₁₇₃ T A S X₁₇₇ S G X₁₈₀ I V N X₁₈₄ P Q F Q A
X₁₉₀ Y N X₁₉₃ X₁₉₄ K A G V R H X₂₀₁ A X₂₀₃ S L A V E X₂₀₉ A P F A R V N S X₂₁₈ S
P G Y I X₂₂₄ T X₂₂₆ I X₂₂₈ X₂₂₉ F X₂₃₁ P X₂₃₃ X₂₃₄ X₂₃₅ Q X₂₃₇ X₂₃₈ W W S L V P L
G R G G E X₂₅₁ A E L X₂₅₅ G A Y L X₂₆₀ L X₂₆₂ S D A G S Y A T G X₂₇₂ D X₂₇₄
X₂₇₅ V D G G Y T L X₂₈₃

本発明の K R E D ポリペプチドについての種々の残基位置における変化の多様性は、以下の表 4 において、矢印の右に示され、そして配列番号 2 の C . m a g n o l i a e K R E D ポリペプチド (Genbank 登録番号 J C 7 3 3 8、G I : 1 1 3 6 0 5 3 8) に対応するアミノ酸残基は、その矢印の左に示される：

【 0 1 2 7 】

【表 4 - 1】

表 4

X ₂ :	A→V
X ₃ :	K→E
X ₅ :	F→L, C
X ₇ :	N→K
X ₉ :	E→K, G
X ₁₂ :	A→V
X ₁₃ :	P→L
X ₁₄ :	P→A
X ₁₆ :	A→G, V
X ₁₈ :	T→A
X ₁₉ :	K→I
X ₂₀ :	N→D, S
X ₂₁ :	E→K
X ₂₂ :	S→N, T
X ₂₃ :	L→P
X ₂₄ :	Q→H, R
X ₂₅ :	V→A
X ₃₂ :	N→D, S
X ₃₆ :	A→T
X ₄₁ :	S→G
X ₄₂ :	S→N
X ₄₅ :	I→L
X ₄₈ :	A→T
X ₅₆ :	V→A
X ₆₀ :	V→I
X ₆₄ :	Y→H
X ₆₅ :	N→D, K, Y, S
X ₆₆ :	S→G, R
X ₆₇ :	H→L, Q
X ₆₈ :	D→G, N
X ₇₁ :	G→D
X ₇₄ :	E→G, K
X ₇₈ :	K→R
X ₇₉ :	K→R
X ₈₅ :	K→R
X ₈₆ :	A→V
X ₉₀ :	N→D
X ₉₃ :	S→N, C
X ₉₅ :	D→E, G, N, V, Y
X ₉₈ :	K→R
X ₉₉ :	Q→R, H, L
X ₁₀₀ :	T→A
X ₁₀₁ :	I→V
X ₁₀₃ :	Q→R
X ₁₀₅ :	I→V, T

10

20

30

40

【表 4 - 2】

X ₁₀₆ :	K→R, Q
X ₁₁₀ :	H→Y, C, R
X ₁₁₄ :	V→A
X ₁₁₆ :	A→G
X ₁₂₀ :	I→V
X ₁₂₄ :	K→R
X ₁₂₉ :	D→G, N
X ₁₃₁ :	D→G, V
X ₁₃₂ :	D→N
X ₁₃₄ :	K→M, V, E, R
X ₁₃₇ :	D→G, N
X ₁₃₈ :	Q→L
X ₁₄₀ :	V→I
X ₁₄₃ :	D→N
X ₁₄₄ :	L→F
X ₁₄₅ :	K→R
X ₁₄₇ :	V→A
X ₁₅₀ :	V→A
X ₁₅₃ :	H→Y, Q
X ₁₅₇ :	H→Y
X ₁₅₈ :	F→L, Y
X ₁₅₉ :	R→K
X ₁₆₀ :	E→G, V
X ₁₆₂ :	F→Y, S
X ₁₆₃ :	E→G, K
X ₁₆₄ :	K→R
X ₁₆₅ :	E→D, G, K
X ₁₆₇ :	K→I, R
X ₁₇₀ :	A→S
X ₁₇₂ :	V→I
X ₁₇₃ :	F→C
X ₁₇₇ :	M→V, T
X ₁₈₀ :	H→Y
X ₁₈₄ :	V→I
X ₁₉₀ :	T→A
X ₁₉₃ :	A→V
X ₁₉₄ :	A→V
X ₂₀₁ :	F→L
X ₂₀₃ :	K→R
X ₂₀₉ :	F→Y
X ₂₁₈ :	V→I
X ₂₂₄ :	N→S
X ₂₂₆ :	E→K, G, D
X ₂₂₈ :	S→T
X ₂₂₉ :	D→A
X ₂₃₁ :	V→I, A

10

20

30

40

【表 4 - 3】

X ₂₃₃ :	Q→K, R
X ₂₃₄ :	E→G, D
X ₂₃₅ :	T→A, K
X ₂₃₇ :	N→Y
X ₂₃₈ :	K→R, E
X ₂₅₁ :	T→A
X ₂₅₅ :	V→A
X ₂₆₀ :	F→L
X ₂₆₂ :	A→V
X ₂₇₂ :	T→A
X ₂₇₄ :	I→L
X ₂₇₅ :	I→L, V
X ₂₈₃ :	P→R

10

【実施例】

【0130】

(実施例1: ケトレダクターゼの発現のための発現構築物の構築)

Candida magnoliae ケトレダクターゼの遺伝子のアナログを、*E. coli* における発現のためにコドン最適化し、そして GenBank 登録番号 JC7338 として開示される公知の配列に基づいて合成した。上記アナログ遺伝子を、60マールのオリゴマーを用いて合成し、そして *lac* プロモーター遺伝子および *lacI* リプレッサー遺伝子の制御下にある発現ベクター (図3の pCK110900) 中にクローン化して、プラスミド pKRED を作製した。上記発現ベクターはまた、P15a 複製起点および クロラムフェニコール耐性遺伝子を含んでいた。いくつかのクローンは、(実施例4の方法により) 活性なケトレダクターゼを発現したことが見出され、そして上記合成遺伝子を配列決定した。CR2-5 と呼ばれる配列 (配列番号1) を、全てのさらなる変異および シャッフリングのための出発物質として使用した。CR2-5 は、野生型 *Candida magnoliae* ケトレダクターゼ (GenBank 登録番号 JC7338) と約 60% の核酸同一性を有していた。

20

30

【0131】

(実施例2: KRED の生成)

通気性振盪発酵槽において、0.528 g/L の硫酸アンモニウム、7.5 g/L のリン酸水素二カリウム三水和物、3.7 g/L のリン酸二水素カリウム、2 g/L の Tastone-154 酵母抽出物、0.05 g/L の硫酸鉄および 3 ml/L の微量元素溶液 (2 g/L の塩化カルシウム二水和物、2.2 g/L の硫酸亜鉛七水和物、0.5 g/L の硫酸マンガン一水和物、1 g/L の硫酸銅四水和物、0.1 g/L のホウ酸ナトリウム十水和物および 0.5 g/L の EDTA を含有する) を含有する 10.0 L の増殖培地を、30 の温度まで上昇させた。

【0132】

上記発酵槽に、LB、1% グルコース (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) および 30 μg/ml のクロラムフェニコール (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含む振盪フラスコにおいて増殖した、*Escherichia coli* W3110 (pCR2-5) の対数増殖期後期の培養物を植え付けて、600 nm (OD₆₀₀) で 0.5 ~ 2.0 の初期吸光度とした。その発酵槽を、500 rpm ~ 1500 rpm で振盪し、そして空気を、1.0 L/分 ~ 15.0 L/分で発酵管に供給し、そしてその培養物の pH を、20% v/v 水酸化アンモニウムを添加することによって 7.0 に制御した。上記培養物が 40 の OD₆₀₀ に達した後、その温度を 25 まで低下させ、そして 1 mM の最終濃度まで イソプロピル-D-チオガラクトシド (IPTG) (Sigma Chemical Corp., S

40

50

t. Louis, MO) を添加することによって、グルコースデヒドロゲナーゼの発現を誘導した。上記培養物を、さらに 15 時間増殖させた。誘導後、細胞を遠心分離によって採取し、そして 10 mM のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄した。その細胞ペーストを、その後の回復プロセスにおいて直接使用するか、または使用まで -80 に保存した。

【0133】

(実施例 3: (凍結乾燥された) ケトレダクターゼ酵素調製物)

上記細胞ペーストを、細胞ペーストの湿重量の 1 容量に対して 3 倍容量の 100 mM トリス / 硫酸塩 (pH 7.2) 中に懸濁し、その後、Sorval 12BP において 40 分間、5000 g で遠心分離することによって洗浄した。上記洗浄した細胞ペーストを、2 倍容量の 100 mM トリス / 硫酸塩 (pH 7.2) に懸濁した。第 1 のパスについて 14,000 psi を用い、そして第 2 のパスについて 8,000 psi を用いた 2 パスのホモジナイザーに上記懸濁液を通すことによって、細胞内 KRED を細胞から放出させた。上記溶解産物を室温まで温め、次いで、ポリエチレンイミン (PEI) (pH 7.2) の 10 % w/v 溶液をその溶解産物に添加して、0.75 % w/v の最終 PEI 濃度とし、そして 30 分間攪拌した。上記処理したホモジネートを、Beckman 実験用遠心分離機において、60 分間、10,000 rpm で遠心分離した。上記上清をデカントし、そして容器に再懸濁して、-20 で凍らせ、凍結乾燥した。

10

【0134】

(実施例 4: ケトレダクターゼ (KRED) 酵素活性アッセイ)

細胞を、1 % グルコースおよび 30 μ g/ml のクロラムフェニコールを含有する tetrific broth (TB) 中で一晚増殖させた。その培養物を、30 μ g/ml のクロラムフェニコールを含有する新鮮な TB 中に 10 倍希釈し、30 で 2 時間増殖させた後、30 μ g/ml のクロラムフェニコールおよび 8 mM の IPTG (イソプロピルチオガラクトシド) を含有する 1/8 容量の TB を添加した。その培養物 (0.5 ml) を、30 でさらに 6 時間増殖させた。

20

【0135】

溶解緩衝液は、100 mM のトリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.0)、2 mg/ml PMBS (硫酸ポリミキシン (polymixin) B)、2 μ l の Dnase (2000 U/ml)、1 mg/ml のリゾチーム、1 mM の PMSF (フッ化フェニルメチルスルホニル) を含む。

30

【0136】

細胞を、遠心分離によってペレットにし、そして、室温で 2 時間振盪することにより、0.25 ml の溶解緩衝液中に溶解する。

【0137】

アッセイ混合物は、1 容量の 100 mM のトリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.0)、0.1 mM ~ 0.2 mM の NADPH または NADH、600 mM のグルコースおよび 600 mM のグルコン酸と、1 容量のエチル - 4 - クロロ - 3 - ケト - ブチレート (ECKB) (1 部) および酢酸ブチル (2 部) の溶液とを、10 分間混合し、そしてその相を分離させることによって得られた水相である。上記反応を、100 mM トリエタノールアミン緩衝液 (pH 7.0) 中に予め溶解した溶液としてケトレダクターゼ酵素を添加することによって、開始した。反応の進行を、時間の関数として、340 nm の吸光度の減少を測定することによるかまたは 440 nm の蛍光の光放射によって追跡した。その結果を、時間に対する吸光度単位または相対蛍光単位 (RFU) (NADPH または NADH) としてプロットし、そのプロットの傾き (吸光度単位 / 分または RFU / 分) を決定した。

40

【0138】

本発明は、特定の実施形態に対する参照とともに記載されるが、本発明の範囲から逸脱することなく、種々の変更がなされ得、そして等価物が置換され得ることを、当業者は理解する。さらに、多くの改変が、本発明の範囲から逸脱することなく、特定の状況または

50

特定の物質を本発明の教示に適合するようになされ得る。従って、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されることなく、添付の特許請求の範囲内にある全ての実施形態を含むことが意図される。

【0139】

(実施例5 KRED / GDH結合化学アッセイ)

pH電極制御自動滴定器を備える100mLの容器に、100mLのトリエタノールアミン緩衝液(pH7、25mL)中のグルコース(7.5g)の溶液を注いだ。この溶液に、上記2つの酵素(100mg KRED; 50mg GDH)およびNADP(6.25mg)を注いだ。次いで、酢酸ブチル(10mL)を注いだ。最後に、酢酸ブチル(10mL)中の4-クロロアセト酢酸エチル(6g)を、その容器に注いだ。4M NaOHを、(6.85のpHを、下限値として設定した)自動滴定器によって必要に応じて滴下して、そのpHを常に7.0に調整した。水酸化物(caustic)が必要とされなくなった時に、その反応は完了した。その反応速度を、単位時間あたりの添加された塩基の量を測定することによるか、またはその反応混合物のサンプルをとり、そのサンプルを等しい容量の酢酸エチルで3回抽出し、そしてその合わせた有機層をガスクロマトグラフィーで分析して、単位時間あたりの(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシ酪酸エチルの量を決定することによって、決定した。

10

【0140】

本発明は、特定の実施形態に対する参照とともに記載されているが、本発明の範囲から逸脱することなく、種々の変更がなされ得、そして等価物が置換され得ることを、当業者は理解する。さらに、多くの改変が、その範囲から逸脱することなく、特定の状況または特定の物質を本発明の教示に適合させるようになされ得る。従って、本発明は、開示される特定の実施形態に限定されることなく、添付の特許請求の範囲内にある全ての実施形態を含むことが、意図される。

20

【図面の簡単な説明】

【0141】

【図1】図1は、酸化還元サイクルを例示する。このサイクル中、ケトレダクターゼは、還元剤NADPH存在下でケトン還元して、対応する-ヒドロキシ誘導体およびNADPとし、そして、グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)は、酸化されてグルコン酸となるグルコース存在下で、NADPを還元しNADPHに戻す。この反応で生成されるグルコン酸は、水酸化ナトリウムで中和されグルコン酸ナトリウムとなる。

30

【図2A】図2A~2Hは、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明のKREDポリペプチドと、示された5つの先行技術文献(図2Aの列1~列5)のKREDポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献(WO2000155342)のアミノ酸配列は、配列番号2(CR2-05)として提供される。図2A~2Hを作成するために、Global Alignment Scoring Matrix: 導入ギャップ=-22.183および伸長ギャップ=-1.396のギャップペナルティを有するPAM120マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント(ギャップを有する)(p)において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B.およびWunsch, C. D. 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48:443~453(1970)を参照のこと。

40

【図2B】図2A~2Hは、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明のKREDポリペプチドと、示された5つの先行技術文献(図2Aの列1~列5)のKREDポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献(WO2000155342)のアミノ酸配列は、配列番号2(CR2-05)として提供される。図2A~2Hを作成するために、Global Alignment Scoring

50

Matrix: 導入ギャップ = - 22.183 および伸長ギャップ = - 1.396 のギャップペナルティを有する PAM120 マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント (ギャップを有する) (p) において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B. および Wunsch, C. D. 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48: 443 ~ 453 (1970) を参照のこと。

【図 2 C】図 2 A ~ 2 H は、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明の K R E D ポリペプチドと、示された 5 つの先行技術文献 (図 2 A の列 1 ~ 列 5) の K R E D ポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献 (W O 2 0 0 1 5 5 3 4 2) のアミノ酸配列は、配列番号 2 (C R 2 - 0 5) として提供される。図 2 A ~ 2 H を作成するために、Global Alignment Scoring Matrix: 導入ギャップ = - 22.183 および伸長ギャップ = - 1.396 のギャップペナルティを有する PAM120 マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント (ギャップを有する) (p) において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B. および Wunsch, C. D. 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48: 443 ~ 453 (1970) を参照のこと。

【図 2 D】図 2 A ~ 2 H は、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明の K R E D ポリペプチドと、示された 5 つの先行技術文献 (図 2 A の列 1 ~ 列 5) の K R E D ポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献 (W O 2 0 0 1 5 5 3 4 2) のアミノ酸配列は、配列番号 2 (C R 2 - 0 5) として提供される。図 2 A ~ 2 H を作成するために、Global Alignment Scoring Matrix: 導入ギャップ = - 22.183 および伸長ギャップ = - 1.396 のギャップペナルティを有する PAM120 マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント (ギャップを有する) (p) において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B. および Wunsch, C. D. 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48: 443 ~ 453 (1970) を参照のこと。

【図 2 E】図 2 A ~ 2 H は、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明の K R E D ポリペプチドと、示された 5 つの先行技術文献 (図 2 A の列 1 ~ 列 5) の K R E D ポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献 (W O 2 0 0 1 5 5 3 4 2) のアミノ酸配列は、配列番号 2 (C R 2 - 0 5) として提供される。図 2 A ~ 2 H を作成するために、Global Alignment Scoring Matrix: 導入ギャップ = - 22.183 および伸長ギャップ = - 1.396 のギャップペナルティを有する PAM120 マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント (ギャップを有する) (p) において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B. および Wunsch, C. D. 「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48: 443 ~ 453 (1970) を参照のこと。

r Biology, 48:443~453(1970)を参照のこと。

【図2F】図2A~2Hは、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明のKREDポリペプチドと、示された5つの先行技術文献(図2Aの列1~列5)のKREDポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献(WO200155342)のアミノ酸配列は、配列番号2(CR2-05)として提供される。図2A~2Hを作成するために、Global Alignment Scoring Matrix:導入ギャップ=-22.183および伸長ギャップ=-1.396のギャップペナルティを有するPAM120マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント(ギャップを有する)(p)において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B.およびWunsch, C. D.「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48:443~453(1970)を参照のこと。

【図2G】図2A~2Hは、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明のKREDポリペプチドと、示された5つの先行技術文献(図2Aの列1~列5)のKREDポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献(WO200155342)のアミノ酸配列は、配列番号2(CR2-05)として提供される。図2A~2Hを作成するために、Global Alignment Scoring Matrix:導入ギャップ=-22.183および伸長ギャップ=-1.396のギャップペナルティを有するPAM120マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント(ギャップを有する)(p)において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B.およびWunsch, C. D.「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48:443~453(1970)を参照のこと。

【図2H】図2A~2Hは、合わせて、それらの配列番号により同定された本発明のKREDポリペプチドと、示された5つの先行技術文献(図2Aの列1~列5)のKREDポリペプチドとのアミノ酸同一性%を比較する表を提供する。第一の先行技術文献(WO200155342)のアミノ酸配列は、配列番号2(CR2-05)として提供される。図2A~2Hを作成するために、Global Alignment Scoring Matrix:導入ギャップ=-22.183および伸長ギャップ=-1.396のギャップペナルティを有するPAM120マトリックスのための動的計画法アルゴリズムを使用して、アライメントを行った。同一性%は、第一配列と第二配列との間の同一残基の数を、部分一致を示すアライメント(ギャップを有する)(p)において第一配列の長さで割ったものと等しい。Needleman, S. B.およびWunsch, C. D.「A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins」Journal of Molecular Biology, 48:443~453(1970)を参照のこと。

【図3】図3は、P15A複製起点(P15A ori)、lacI、CAP結合部位、lacプロモーター(lac)、T7リボソーム結合部位(T7g10 RBS)、およびクロラムフェニコール耐性遺伝子(camR)を含む本発明の4036bpの発現ベクター(pCK110900)である。

【図 1】

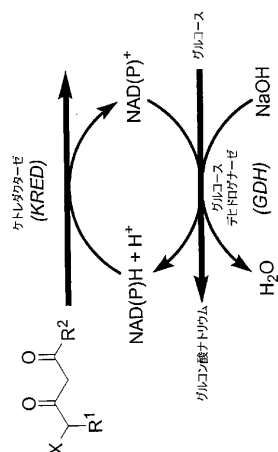


FIG. 1

【図 2 A】

配列番号: (または、先行技術文献)	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
(WO200155342)	100.0	45.8	47.4	49.7	100.0
(WO200253728)	45.8	100.0	40.1	42.3	45.8
(WO200266616)	47.4	40.1	100.0	44.9	47.4
(WO200286090)	49.7	42.3	44.9	100.0	49.7
(WO9835025)	100.0	45.8	47.4	49.7	100.0
542	98.6	45.8	46.7	50.2	98.6
540	98.6	45.5	46.7	49.8	98.6
538	98.2	45.5	46.3	49.8	98.2
536	97.5	45.1	46.3	49.3	97.5
534	98.2	45.1	46.7	49.8	98.2
532	97.9	44.8	46.3	49.5	97.9
530	98.6	45.1	46.3	49.5	98.6
528	97.9	45.8	46.7	49.5	97.9
526	98.2	44.8	46.3	49.5	98.2
524	98.2	45.1	46.7	49.8	98.2
522	98.6	45.5	46.3	49.8	98.6
520	97.9	44.8	46.7	49.8	97.9
518	97.9	44.8	46.7	49.8	97.9
516	97.9	44.4	46.3	49.5	97.9
514	98.6	44.8	46.7	49.3	98.6
512	98.2	45.1	46.7	49.8	98.2
510	98.2	44.8	46.3	49.3	98.2
508	97.5	45.1	46.0	49.0	97.5
506	98.6	45.5	46.3	49.8	98.6
504	98.2	45.1	46.3	49.8	98.2
502	98.9	45.5	46.3	49.5	98.9
500	98.6	45.5	46.3	49.0	98.6
498	98.6	44.8	46.7	49.3	98.6
496	98.6	45.5	46.7	49.7	98.6
494	98.6	45.5	46.3	49.3	98.6
492	98.2	44.8	47.0	49.0	98.2
490	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
488	97.9	45.1	46.7	49.7	97.9
486	98.2	44.8	46.7	49.3	98.2
484	97.9	45.5	46.0	49.0	97.9
482	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
480	98.6	45.8	46.3	49.5	98.6
478	98.2	45.5	46.3	49.2	98.2

FIG. 2A

【図 2 B】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
476	98.9	45	46.3	49.7	98.9
474	98.6	45.8	46.3	49.7	98.6
472	98.2	46.2	46.3	49.2	98.2
470	98.2	45.1	46.7	49.0	98.2
468	98.6	45.5	46.0	49.0	98.6
466	98.6	45.1	47.0	49.3	98.6
464	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
462	98.9	45.5	46.3	49.3	98.9
460	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
458	98.9	45.5	46.7	49.7	98.9
456	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
454	98.9	45.5	46.7	49.0	98.9
452	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
450	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
448	98.6	45.8	46.3	49.7	98.6
446	98.6	45.5	47.0	49.3	98.6
444	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
442	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
440	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
438	98.6	45.1	46.7	49.3	98.6
436	98.6	45.8	47.0	49.3	98.6
434	98.9	45.8	46.3	49.3	98.9
432	98.9	45.5	47.0	49.3	98.9
430	98.6	45.8	47.0	49.0	98.6
428	98.9	45.5	47.0	49.3	98.9
426	98.9	45.8	47.0	49.3	98.9
424	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
422	98.9	45.5	47.0	49.3	98.9
420	98.6	45.5	46.3	49.0	98.6
418	98.9	45.1	47.0	49.3	98.9
416	98.6	45.1	47.0	49.7	98.6
414	98.9	45.5	47.4	49.5	98.9
412	98.2	45.5	46.3	48.8	98.2
410	98.9	45.5	46.7	49.3	98.9
408	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
406	98.6	45.1	46.7	49.3	98.6
404	98.6	45.8	47.0	49.0	98.6
402	98.6	45.8	47.0	49.0	98.6

FIG. 2B

【図 2 C】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
400	98.6	45.1	46.3	49.0	98.6
398	98.6	45.8	46.7	49.8	98.6
396	98.6	45.1	46.3	49.3	98.6
394	98.9	45.5	46.7	49.0	98.9
392	98.9	45.5	46.3	49.3	98.9
390	98.9	45.5	46.7	49.3	98.9
388	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
386	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
384	98.6	46.5	46.7	49.3	98.6
382	98.9	45.5	46.7	49.3	98.9
380	98.9	45.5	46.3	49.3	98.9
378	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
376	98.9	45.5	46.7	49.3	98.9
374	98.9	45.8	46.3	49.0	98.9
372	98.9	45.5	47.0	49.0	98.9
370	98.9	45.5	46.7	49.3	98.9
368	98.9	46.5	46.7	49.0	98.9
366	98.6	45.1	46.3	49.0	98.6
364	98.6	45.1	46.3	49.0	98.6
362	98.6	45.1	46.3	49.0	98.6
360	98.9	46.2	47.7	49.7	98.9
358	98.6	45.5	46.3	49.2	98.6
356	98.2	45.1	46.3	49.0	98.2
354	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
352	98.6	45.5	46.7	49.0	98.6
350	99.3	45.5	47.0	49.3	99.3
348	98.9	45.1	47.0	49.3	98.9
346	98.6	46.2	47.0	50.3	98.6
342	97.2	45.5	47.4	48.6	97.2
340	99.3	45.8	46.7	49.7	99.3
338	98.6	45.5	46.7	49.0	98.6
336	98.9	45.8	47.0	49.7	98.9
334	98.9	45.5	46.7	49.3	98.9
332	99.3	45.8	47.0	49.7	99.3
330	99.3	45.5	47.0	49.7	99.3
344	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
328	99.6	45.8	47.0	49.7	99.6
326	98.6	45.8	46.7	49.7	98.6

FIG. 2C

【図 2 D】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
324	98.9	45.1	46.3	49.3	98.9
322	99.3	45.5	46.7	49.0	99.3
320	98.6	45.8	47.0	49.0	98.6
318	99.3	45.5	46.7	49.7	99.3
316	97.9	45.8	47.0	49.0	97.9
314	98.9	45.5	46.7	49.7	98.9
312	99.3	45.8	47.0	49.7	99.3
310	98.6	45.5	47.7	49.7	98.6
308	98.2	45.8	47.4	49.7	98.2
306	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
304	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
302	98.9	45.8	47.4	49.3	98.9
300	99.3	46.2	48.1	49.3	99.3
298	98.9	45.8	47.0	49.3	98.9
296	98.9	45.1	46.7	49.3	98.9
294	98.6	45.5	46.3	49.0	98.6
292	98.2	45.1	46.7	48.6	98.2
290	98.9	45.8	47.0	49.3	98.9
288	98.9	45.8	46.3	49.3	98.9
286	98.2	45.5	46.7	49.0	98.2
284	98.6	45.5	46.7	49.0	98.6
282	98.2	45.8	46.3	49.2	98.2
280	97.9	44.8	46.7	49.3	97.9
278	98.6	44.8	46.3	49.0	98.6
276	99.3	45.5	47.0	49.7	99.3
274	99.3	45.8	46.7	49.3	99.3
272	98.9	45.8	47.0	49.0	98.9
270	98.6	45.8	46.7	49.7	98.6
268	99.6	45.8	47.0	49.7	99.6
266	98.6	45.1	46.7	49.3	98.6
264	98.9	45.1	46.7	49.0	98.9
262	98.9	45.5	46.3	49.0	98.9
260	98.9	46.2	47.7	49.3	98.9
258	99.6	45.8	47.0	49.7	99.6
256	98.2	45.5	47.7	49.0	98.2
254	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
252	99.3	45.8	47.0	49.7	99.3
250	98.9	45.5	47.0	49.3	98.9

FIG. 2D

【図 2 E】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
248	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
246	98.9	45.1	47.0	49.0	98.9
244	98.9	45.5	46.7	49.0	98.9
242	99.3	45.5	46.7	49.3	99.3
240	96.1	45.5	47.0	48.6	96.1
238	96.5	46.5	47.4	49.0	96.5
236	97.2	46.5	48.1	49.7	97.2
234	97.2	45.8	47.4	49.0	97.2
232	98.6	45.8	48.1	49.0	98.6
230	97.2	46.2	48.1	48.6	97.2
228	96.1	47.2	46.7	49.0	96.1
226	99.3	45.8	47.4	49.7	99.3
224	99.6	45.8	47.0	49.7	99.6
222	98.6	46.5	48.1	49.7	98.6
220	98.9	47.2	48.4	49.7	98.9
218	97.5	45.5	48.1	50.0	97.5
216	98.9	46.2	48.1	49.3	98.9
214	98.2	46.2	47.4	49.0	98.2
212	98.2	46.5	47.0	49.5	98.2
210	97.5	46.2	48.1	49.3	97.5
208	98.9	46.2	48.4	49.3	98.9
206	98.6	45.8	47.7	49.0	98.6
204	98.2	45.5	48.1	49.0	98.2
202	97.5	46.9	47.7	49.0	97.5
200	95.1	46.2	47.4	49.7	95.1
198	95.8	45.8	47.7	49.0	95.8
196	99.3	46.2	48.1	49.7	99.3
194	97.2	46.5	48.8	48.6	97.2
192	96.1	46.9	48.1	48.0	96.1
190	97.9	45.8	48.1	49.0	97.9
188	98.6	46.2	48.4	49.0	98.6
186	98.6	46.5	48.1	49.3	98.6
184	96.5	45.8	46.7	48.3	96.5
182	98.2	45.8	48.4	49.3	98.2
180	98.6	46.2	47.4	49.0	98.6
178	98.2	46.2	48.4	49.3	98.2
176	98.2	46.5	48.1	49.3	98.2
174	97.2	45.5	48.4	49.3	97.2
172	97.5	46.5	47.4	48.6	97.5

FIG. 2E

【図 2 F】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
170	97.5	45.8	47.7	49.3	97.5
168	97.5	46.2	47.4	49.0	97.5
166	97.9	46.5	48.1	48.6	97.9
164	98.2	46.5	47.7	49.7	98.2
162	98.9	46.2	48.1	49.7	98.9
160	97.2	45.8	47.7	49.0	97.2
158	97.5	46.2	48.1	49.7	97.5
156	98.6	46.5	47.7	50.0	98.6
154	98.9	45.8	47.7	49.3	98.9
152	98.6	46.5	47.7	50.0	98.6
150	96.8	47.2	47.7	49.0	96.8
148	98.2	46.5	48.1	49.0	98.2
146	98.2	46.5	48.4	49.0	98.2
144	98.2	46.5	47.7	49.3	98.2
142	95.8	45.8	47.7	48.0	95.8
140	98.2	46.5	48.1	49.0	98.2
138	97.2	46.9	47.7	49.0	97.2
136	98.6	46.5	48.4	49.0	98.6
134	96.1	45.8	48.4	48.6	96.1
132	97.5	46.2	48.4	48.6	97.5
130	95.8	46.2	47.7	48.6	95.8
128	98.2	46.5	48.4	49.0	98.2
126	97.2	46.5	48.4	48.3	97.2
124	97.5	45.8	47.7	48.6	97.5
122	95.8	45.5	48.4	47.6	95.8
120	97.9	46.2	48.4	49.0	97.9
118	97.2	47.2	48.1	49.0	97.2
116	98.2	46.9	48.1	49.7	98.2
114	96.8	45.8	48.4	49.0	96.8
112	97.5	46.2	47.7	48.6	97.5
110	98.2	46.5	48.1	49.3	98.2
108	98.2	45.8	48.1	49.0	98.2
106	96.1	47.2	47.7	49.3	96.1
104	98.2	45.8	47.7	49.0	98.2
102	98.9	46.2	48.4	49.3	98.9
100	97.2	46.9	47.7	49.3	97.2
98	98.6	46.2	47.4	49.3	98.6
96	99.6	45.8	47.0	49.7	99.6

FIG. 2F

【図 2 G】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
94	99.3	46.2	47.0	50.0	99.3
92	99.6	45.8	47.7	49.3	99.6
90	98.9	45.5	47.0	49.7	98.9
88	99.6	45.8	47.4	50.0	99.6
86	99.6	45.5	47.4	49.7	99.6
84	99.3	45.8	47.7	49.3	99.3
82	99.3	45.8	47.7	49.7	99.3
80	99.6	45.8	47.4	49.3	99.6
78	99.3	46.2	48.1	49.7	99.3
76	99.3	46.2	48.1	49.7	99.3
74	99.6	46.2	47.4	49.3	99.6
72	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6
70	99.6	45.8	47.7	49.3	99.6
68	98.9	45.5	47.4	50.0	98.9
66	98.9	45.8	48.1	49.0	98.9
64	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6
62	99.6	45.5	47.0	49.3	99.6
60	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6
58	99.6	45.8	47.7	50.0	99.6
56	99.3	45.5	47.4	49.7	99.3
54	99.3	46.2	48.1	49.7	99.3
52	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6
50	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6
48	99.6	46.5	47.4	49.7	99.6
46	99.3	45.8	47.0	49.3	99.3
44	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6
42	98.6	45.8	47.4	50.0	98.6
40	99.6	45.8	47.7	49.7	99.6
38	98.9	45.8	47.0	48.6	98.9
36	99.3	46.2	47.4	50.0	99.3
34	99.3	45.5	47.4	49.3	99.3
32	99.6	45.5	47.7	49.3	99.6
30	99.3	45.8	47.7	49.3	99.3
28	99.6	46.2	47.4	49.3	99.6
26	99.3	45.5	48.1	49.0	99.3
24	99.3	46.2	47.0	49.0	99.3
22	99.6	45.5	47.7	49.3	99.6
20	99.6	45.8	47.7	49.3	99.6
18	99.6	45.8	47.4	49.7	99.6

FIG. 2G

【 図 2 H 】

配列番号:	WO200155342	WO200253728	WO200266616	WO200286090	WO9835025
16	99.3	45.8	46.7	50.0	99.3
14	99.6	45.5	47.0	49.3	99.6
12	99.6	45.5	47.0	49.3	99.6
10	99.6	45.8	47.0	49.7	99.6
8	99.3	45.5	47.0	49.3	99.3
6	99.3	46.2	47.0	50.0	99.3
4	99.3	46.2	47.0	50.0	99.3
2 (CR2-05)	100.0	45.8	47.4	49.7	100.0

FIG. 2H

【 図 3 】

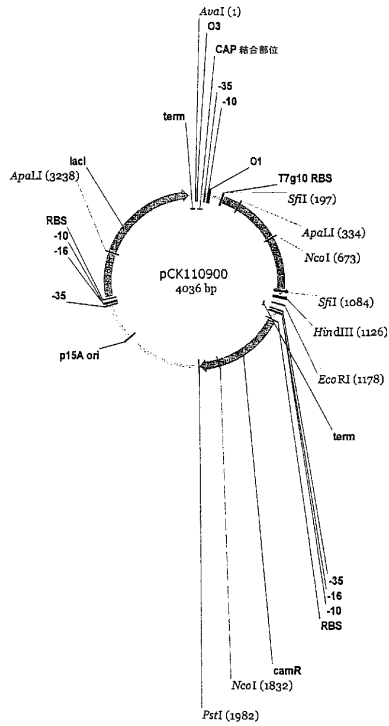


FIG. 3

【 配 列 表 】

2007502124000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/026655

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N9/04 C12N15/63		
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) IPC 7 C12N		
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 practical, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, WPI Data, PAJ, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,Y	EP 1 416 050 A (KANEKAFUCHI CHEMICAL IND) 6 May 2004 (2004-05-06) the whole document in particular: example 2; tables 1-3 -& WO 03/004653 A (KIZAKI NORIYUKI ; NAKAI TAKAHISA (JP); KANEKAFUCHI CHEMICAL IND (JP);) 16 January 2003 (2003-01-16) -----	1-15
Y	US 2002/045233 A1 (HERSHBERGER CHARLES LEE ET AL) 18 April 2002 (2002-04-18) abstract example 5; table 3 -----	1-15
A	WO 98/35025 A (KATAOKA MICHIOHKO ; YAMAMOTO KAZUHIKO (JP); WADA MASARU (JP); HASEGAWA) 13 August 1998 (1998-08-13) cited in the application the whole document ----- -/--	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document 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		Date of mailing of the international search report
9 November 2004		22/11/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US2004/026655

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& US 6 218 156 B1 (KATAOKA MICHIIKO ET AL) 17 April 2001 (2001-04-17) & US 6 448 052 B1 (KATAOKA MICHIIKO ET AL) 10 September 2002 (2002-09-10) -----	
A	YASOHARA Y ET AL: "MOLECULAR CLONING AND OVEREXPRESSION OF THE GENE ENCODING AN NADPH-DEPENDENT CARBONYL REDUCTASE FROM CANDIDA MAGNOLIAE, INVOLVED IN STEREOSELECTIVE REDUCTION OF ETHYL 4-CHLORO-3-OXOBUTANOATE" BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY BIOCHEMISTRY, JAPAN SOC. FOR BIOSCIENCE, BIOTECHNOLOGY AND AGROCHEM. TOKYO, JP, vol. 64, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 1430-1436, XP001105969 ISSN: 0916-8451 abstract figures 1,2; table 3 -----	1-15
A	JOERNWALL H ET AL: "SHORT-CHAIN DEHYDROGENASES/REDUCTASES (SDR)" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 34, no. 18, 9 May 1995 (1995-05-09), pages 6003-6013, XP000929805 ISSN: 0006-2960 -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US2004/026655

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1416050	A	06-05-2004	CA 2450867 A1 EP 1416050 A1 WO 03004653 A1	16-01-2003 06-05-2004 16-01-2003
WO 03004653	A	16-01-2003	CA 2450867 A1 EP 1416050 A1 WO 03004653 A1	16-01-2003 06-05-2004 16-01-2003
US 2002045233	A1	18-04-2002	AU 1302999 A EP 0918090 A2 WO 9923242 A1	24-05-1999 26-05-1999 14-05-1999
WO 9835025	A	13-08-1998	AU 4032997 A CA 2280502 A1 EP 0967271 A1 WO 9835025 A1 SI 20120 A SK 105699 A3 US 6218156 B1 US 2002006651 A1	26-08-1998 13-08-1998 29-12-1999 13-08-1998 30-06-2000 12-06-2000 17-04-2001 17-01-2002
US 6218156	B1	17-04-2001	AU 4032997 A CA 2280502 A1 EP 0967271 A1 WO 9835025 A1 SI 20120 A SK 105699 A3 US 2002006651 A1	26-08-1998 13-08-1998 29-12-1999 13-08-1998 30-06-2000 12-06-2000 17-01-2002
US 6448052	B1	17-01-2002	US 2002006651 A1 AU 4032997 A CA 2280502 A1 EP 0967271 A1 WO 9835025 A1 SI 20120 A SK 105699 A3 US 6218156 B1	17-01-2002 26-08-1998 13-08-1998 29-12-1999 13-08-1998 30-06-2000 12-06-2000 17-04-2001

フロントページの続き

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

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ジェンヌ, ステファーン ジェイ.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 1 0, バーリングゲーム, エル カミノ リアル 8
 2 1 ナンバー 2 0 2

(72)発明者 クレベル, アンケ
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 3 0 3, パロ アルト, ルイス ロード 3 5 0 0

(72)発明者 ユイスマン, ジャルト ダブリュー.
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 7 0, サン カルロス, ハワード アベニュー 2
 2 1 1

(72)発明者 ニューマン, リサ マリー
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 6 1, レッドウッド シティ, キング ストリー
 ト 1 0 0 2

F ターム(参考) 4B024 AA03 AA20 BA08 CA02 DA06 EA04 FA10 GA11 GA19 GA25
 HA01 HA20
 4B050 CC04 DD04 EE01 HH01 LL05
 4B065 AA01X AA26X AA58X AA72X AA73Y AA87X AB01 AC14 BA02 BA16
 BA24 BB01 BB15 BC02 BC03 BC26 BD11 CA28