

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2014年10月2日(02.10.2014)



(10) 国際公開番号  
WO 2014/157185 A1

- (51) 国際特許分類:  
*C12N 15/09* (2006.01) *C12N 9/02* (2006.01)  
*C12N 1/21* (2006.01) *C12P 7/02* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2014/058248
- (22) 国際出願日: 2014年3月25日(25.03.2014)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願 2013-070170 2013年3月28日(28.03.2013) JP
- (71) 出願人: 株式会社カネカ(KANEKA CORPORATION) [JP/JP]; 〒5308288 大阪府大阪市北区中之島二丁目3番18号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 松井 美里(MATSUI Misato); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 伊藤 紀幸(ITO Noriyuki); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 川野 茂(KAWANO Shigeru); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP). 八十原 良彦(YASOHARA Yoshihiko); 〒6768688 兵庫県高砂市高砂町宮前町1-8 株式会社カネカ内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 安富国際特許事務所 (YASUTOMI & ASSOCIATES); 〒5320003 大阪府大阪市淀川区宮原3丁目5番36号 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))  
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))



WO 2014/157185 A1

(54) Title: MODIFIED CARBOXYL REDUCING ENZYME AND GENE

(54) 発明の名称: 改変型カルボニル還元酵素およびその遺伝子

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a modified carbonyl reducing enzyme that modifies a wild type enzyme that loses reactivity in the presence of an organic solvent, and that has reactivity in the presence of an organic solvent that surpasses wild type enzymes. The present inventors discovered a modified carbonyl reducing enzyme with reactivity in the presence of an organic solvent that surpasses that of a wild type enzyme, from within a modified enzyme library where a mutation is randomly introduced into a wild type enzyme gene.

(57) 要約: 本発明の課題は、有機溶剤存在下で反応性が低下する野生型酵素を改変し、有機溶剤存在下での反応性が野生型酵素よりも向上した改変型カルボニル還元酵素および/または該酵素を生産する形質転換体を提供することである。本発明者らは、野生型酵素遺伝子にランダムに変異を導入して作製した変異型酵素ライブラリーの中から、有機溶剤存在下での反応性が野生型酵素よりも向上した改変型カルボニル還元酵素を見出し、本発明を完成するに至った。

## 明 細 書

**発明の名称**： 改変型カルボニル還元酵素およびその遺伝子

### 技術分野

[0001] 本発明は、改変型カルボニル還元酵素、その遺伝子、その遺伝子を含むベクター、およびそのベクターで形質転換された形質転換体に関する。

### 背景技術

[0002] 医薬品や農薬の合成原料および中間体として有用な光学活性アルコールの製造方法の一つとして、カルボニル化合物のカルボニル基を微生物や酵素により不斉還元する方法が知られている。カルボニル化合物を還元する不斉酵素（以下、カルボニル還元酵素）は各種光学活性アルコールの製造において有用である。

[0003] カルボニル還元酵素を用いた不斉還元反応では、基質や生成物、pH調整に使用する酸やアルカリ、反応液性を改善するために添加される界面活性剤や有機溶剤などにより、酵素が失活されることや、酵素反応が阻害されることがある。したがって、有機溶剤等による酵素の失活や反応阻害を回避できるカルボニル還元酵素は、反応時間の短縮や反応収率の向上につながり、光学活性アルコールを工業的に生産する上でさらに有用となる。

[0004] 例えば、ランダム変異導入による有機溶剤耐性の獲得が試みられており、2-プロパノールやジメチルスルホキシドに対する耐性を有する還元酵素が報告されている（特許文献1、非特許文献1）。

[0005] 一方、工業的に有用性の高い有機溶剤である、ジメチルホルムアミドに対して耐性を有する酵素は少なく、実用レベルにジメチルホルムアミド耐性を獲得した還元酵素は報告されていないのが現状である。

### 先行技術文献

#### 特許文献

[0006] 特許文献1：特開2009-225773号公報

#### 非特許文献

[0007] 非特許文献1：ChemSusChem, 1, 431-436 (2008)

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 例えばエゼチミブやモンテルカスト等、医薬品中間体の多くは、2-プロパノールやジメチルスルホキシドよりもジメチルホルムアミドへの溶解度が高い。このような化合物の生産にジメチルホルムアミド耐性酵素を用いることができれば、反応液性を改善でき、他の有機溶剤を使用した場合よりも高い生産性を期待できる。

[0009] そこで、本発明の課題は、ジメチルホルムアミド存在下で反応性が低下する野生型酵素を改変して、有機溶剤存在下での反応性が野生型酵素よりも向上した改変型カルボニル還元酵素および／または該酵素を生産する形質転換体を提供することである。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、野生型酵素遺伝子にランダムに変異を導入して作製した変異型酵素ライブラリーの中から、有機溶剤存在下での反応性が野生型酵素よりも向上した改変型カルボニル還元酵素を見出し、本発明を完成するに至った。

[0011] すなわち、本発明は、以下の(a)～(c)；

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と78%以上の配列同一性を有し、

(b) 2-ペンタノン還元して2-ペンタノールを生成し、かつ、

(c) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤存在下でカルボニル化合物に対する反応性が高い、および／または熱安定性が高い、の性質を示すポリペプチドに関する。

[0012] 前記有機溶剤がジメチルホルムアミドであることが好ましい。

[0013] 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において次の群；

2番目、22番目、25番目、39番目、42番目、45番目、51番目、

56番目、71番目、87番目、90番目、102番目、109番目、124番目、135番目、138番目、155番目、159番目、175番目、177番目、183番目、190番目、195番目、212番目、220番目、226番目、228番目、236番目、238番目、250番目、254番目、257番目、259番目、265番目、267番目、270番目、279番目、298番目、300番目、301番目、および331番目から選択される1つ以上のアミノ酸に、アミノ酸置換が導入されていることが好ましい。

[0014] アミノ酸置換が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において次の群

;

2番目がイソロイシン、22番目がアルギニン、25番目がフェニルアラニン、39番目がアルギニン、42番目がアルギニン、45番目がアスパラギン酸、51番目がアラニン、56番目がリジン、71番目がアスパラギンもしくはアルギニン、87番目がイソロイシン、90番目がグリシン、102番目がイソロイシン、109番目がグリシン、124番目がロイシン、135番目がアラニン、138番目がアスパラギン、155番目がロイシンもしくはアルギニン、159番目がフェニルアラニン、175番目がアスパラギン酸、177番目がフェニルアラニン、183番目がスレオニン、190番目がセリン、195番目がロイシン、212番目がフェニルアラニン、スレオニンもしくはチロシン、220番目がバリン、226番目がグリシン、228番目がバリン、236番目がアスパラギン、238番目がイソロイシン、250番目がプロリン、254番目がアスパラギン、257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、267番目がプロリン、270番目がメチオニン、279番目がアルギニン、298番目がプロリン、300番目がアスパラギン酸、301番目がシステイン、および、331番目がフェニルアラニンに置換されるアミノ酸置換、から選択される1つ以上のアミノ酸置換であることが好ましい。

[0015] アミノ酸置換が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において次の群

;

2番目がイソロイシン、45番目がアスパラギン酸、71番目がアスパラギンもしくはアルギニン、102番目がイソロイシン、124番目がロイシン、175番目がアスパラギン酸、177番目がフェニルアラニン、183番目がスレオニン、195番目がロイシン、220番目がバリン、226番目がグリシン、236番目がアスパラギン、238番目がイソロイシン、257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、267番目がプロリン、270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、および、301番目がシステインに置換されるアミノ酸置換、から選択される1つ以上のアミノ酸置換であり、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤に対する安定性が向上していることが好ましい。

[0016] アミノ酸置換が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において下記の

(1) ~ (35) ;

- (1) 71番目がアスパラギン、195番目がロイシン、
- (2) 71番目がアルギニン、259番目がグルタミン酸、
- (3) 71番目がアルギニン、270番目がメチオニン、
- (4) 71番目がアルギニン、300番目がアスパラギン酸、
- (5) 102番目がイソロイシン、270番目がメチオニン、
- (6) 177番目がフェニルアラニン、220番目がバリン、
- (7) 226番目がグリシン、270番目がメチオニン、
- (8) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、
- (9) 257番目がセリン、270番目がメチオニン、
- (10) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (11) 259番目がグルタミン酸、300番目がアスパラギン酸、
- (12) 267番目がプロリン、270番目がメチオニン、
- (13) 270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、
- (14) 2番目がイソロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目が

メチオニン、

(15) 45番目がアスパラギン酸、175番目がアスパラギン酸、183番目がスレオニン、

(16) 102番目がイソロイシン、226番目がグリシン、267番目がプロリン、

(17) 124番目がロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、

(18) 177番目がフェニルアラニン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、

(19) 220番目がバリン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、

(20) 236番目がアスパラギン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、

(21) 238番目がイソロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、

(22) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、

(23) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、300番目がアスパラギン酸、

(24) 259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、270番目がメチオニン、

(25) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、

(26) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、301番目がシステイン、

(27) 2番目がイソロイシン、238番目がイソロイシン、

(28) 71番目がアスパラギン、195番目がロイシン、

(29) 109番目がグリシン、331番目がフェニルアラニン、

- (30) 124番目がロイシン、236番目がアスパラギン、
- (31) 159番目がフェニルアラニン、259番目がグルタミン酸、
- (32) 42番目がアルギニン、155番目がアルギニン、279番目がアルギニン、
- (33) 45番目がアスパラギン酸、175番目がアスパラギン酸、183番目がスレオニン、
- (34) 155番目がロイシン、250番目がプロリン、298番目がプロリン、および
- (35) 56番目がリジン、138番目がアスパラギン、190番目がセリン、254番目がアスパラギンに置換されるアミノ酸置換、から選択されるアミノ酸置換が導入されていることが好ましい。

[0017] アミノ酸置換が、次の群；

22番目がアルギニン、39番目がアルギニン、51番目がアラニン、87番目がイソロイシン、90番目がグリシン、259番目がグルタミン酸、および、270番目がメチオニンに置換されるアミノ酸置換、から選択される1つ以上のアミノ酸置換であり、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上していることが好ましい。

[0018] アミノ酸置換が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において下記の

(1) ~ (7) ；

- (1) 22番目がアルギニン、
- (2) 22番目がアルギニン、87番目がイソロイシン、
- (3) 39番目がアルギニン、
- (4) 39番目がアルギニン、51番目がアラニン、
- (5) 51番目がアラニン、
- (6) 87番目がイソロイシン、および
- (7) 90番目がグリシンに置換されるアミノ酸置換、

から選択される1つ以上のアミノ酸置換であることが好ましい。

[0019] また、本発明は、前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する。

[0020] また、本発明は、前記ポリヌクレオチドを含むベクターに関する。

[0021] 還元型補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをさらに含むことが好ましい。

[0022] 還元型補酵素再生能を有するポリペプチドがグルコース脱水素酵素であることが好ましい。

[0023] また、本発明は、前記ベクターにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体に関する。

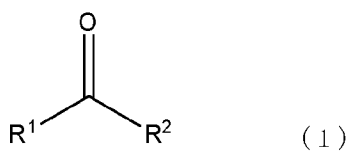
[0024] 前記宿主細胞が大腸菌であることが好ましい。

[0025] また、本発明は、前記ポリペプチド、または、前記形質転換体および／またはその処理物を、カルボニル化合物に作用させることを特徴とする、アルコール化合物の製造方法に関する。

[0026] 前記カルボニル化合物が非対称ケトンであり、前記アルコール化合物が光学活性アルコールであることが好ましい。

[0027] 前記カルボニル化合物が、下記式（1）：

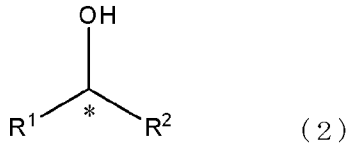
[化1]



（式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は水素原子、ハロゲン原子、置換されていても良いアルキル基、置換されていても良いアラルキル基、置換されていても良いアリール基、置換されていても良いアルコキシ基、アミノ基、またはニトロ基であるか、もしくは、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>が互いに結合し環を形成しても良い。但し、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>は構造が異なる）で表される非対称ケトンであり、

前記アルコール化合物が下記式（2）：

[化2]



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は前記と同じ、\*は不斉炭素を表す) で表される光学活性アルコールであること好ましい。

### 発明の効果

[0028] 本発明により、有機溶剤存在下での反応性が野生型よりも向上した改変型カルボニル還元酵素およびその遺伝子、その遺伝子を含むベクター、そのベクターで形質転換された形質転換体、その形質転換体の処理物の製造方法を提供することができる。

### 発明を実施するための形態

[0029] 本発明のポリペプチドは、以下の(a)～(c)の性質を示すことを特徴とする；

(a) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列と78%以上の配列同一性を有し、(b) 2-ペンタノン還元して2-ペンタノールを生成し、かつ、(c) 配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤存在下でカルボニル化合物に対する反応性が高い、および/または熱安定性が高い。

[0030] [変異の記載方法]

なお、本明細書において、アミノ酸、ペプチド、タンパク質は下記に示すIUPAC-IUB生化学命名委員会(CBN)で採用された略号を用いて表される。また、特に明示しない限り、ペプチドおよびタンパク質のアミノ酸残基の配列は、左端から右端にかけてN末端からC末端となるように表される。また、参照を容易にするため、一般的に用いられている下記の命名法を適用する。1つは、“もとのアミノ酸；位置；置換したアミノ酸”と記述する方法であり、例えば、位置64におけるチロシンのアスパラギン酸への置換は「Y64D」と表される。多重変異については、ハイフン記号“-”に

より分けることで表記する。例えば、「S41A-Y64D」とは、位置41のセリンをアラニンへ、かつ、位置64のチロシンをアスパラギン酸へ置換することを示す。

[0031] [アミノ酸の略号]

A=A l a =アラニン、C=C y s =システイン、  
D=A s p =アスパラギン酸、E=G l u =グルタミン酸、  
F=P h e =フェニルアラニン、G=G l y =グリシン、  
H=H i s =ヒスチジン、I=I l e =イソロイシン、  
K=L y s =リシン、L=L e u =ロイシン、  
M=M e t =メチオニン、N=A s n =アスパラギン、  
P=P r o =プロリン、Q=G l n =グルタミン、  
R=A r g =アルギニン、S=S e r =セリン、  
T=T h r =スレオニン、V=V a l =バリン、  
W=T r p =トリプトファン、Y=T y r =チロシン

[0032] [配列同一性]

ポリペプチドやポリヌクレオチドの「配列同一性」とは、対比される2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチドを最適に整列させ、アミノ酸または核酸塩基（例えば、A、T、C、G、U、またはI）が両方の配列で一致した位置の数を比較塩基総数で除し、そして、この結果に100を乗じた数値で表される。

[0033] 配列同一性は、例えば、以下の配列分析用ツールを用いて算出し得る；G C G W i s c o n s i n P a c k a g e（ウィスコンシン大学）、t h e E x P A S y W o r l d W i d e W e b分子生物学用サーバー（スイスバイオインフォマティックス研究所）、B L A S T（米国生物工学情報センター）、G E N E T Y X（ゼネティックス社）。

[0034] 本発明において、変異を導入する前の野生型酵素は、配列表の配列番号1で表される335個のアミノ酸残基からなり、2-ペンタノンを還元して2-ペンタノールを生成す能力を有するポリペプチドである。

- [0035] ポリペプチドの起源は限定されるものではないが、好ましくはサッカロミセス科 (Saccharomycetaceae)、より好ましくはヴァンデルワルトザイマ (Vanderwaltozyma) 属に属する微生物、さらに好ましくはヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) 種に属する微生物、特に好ましくはヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株由来のカルボニル還元酵素である。当該微生物は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジー本部 生物遺伝資源部門 (NBRC: 〒292-0818 千葉県木更津市かずさ鎌足2-5-8) より入手することができる。
- [0036] 本発明の野生型酵素は、配列表の配列番号2に示されるポリヌクレオチドによりコードされる。例えば、Molecular Cloning 2nd Edition (Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) 等に記載される通常の遺伝子工学的手法に準じてサッカロミセス科、好ましくはヴァンデルワルトザイマ属、より好ましくはヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) 種に属する微生物、さらに好ましくはヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株から取得することができる。
- [0037] 即ち、ヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株のゲノムDNAから [参考例1] に記載の方法でPCRを行うことにより、配列番号1で示されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド、または配列番号2で示されるポリヌクレオチドを増幅して野生型酵素遺伝子を調製することができる。
- [0038] 本発明のポリペプチドは、配列番号1に示すアミノ酸配列に改変を加えて得られるものであっても良い。
- [0039] 配列番号1に示すアミノ酸配列に加える改変としては、置換、付加、挿入も

しくは欠失が挙げられ、1種類の改変（例えば置換）のみを含むものであっても良いし、2種以上の改変（例えば、置換と挿入）を含んでいても良い。上記の「複数個のアミノ酸」とは、例えば、40個、好ましくは20個、より好ましくは10個、さらに好ましくは8個、5個、4個、3個、または2個のアミノ酸を意味する。

[0040] また、改変を加えた後のアミノ酸配列と、配列番号1に示すアミノ酸配列との配列の同一性は85%以上、好ましくは90%以上、より好ましくは92%以上、さらに好ましくは95%以上、97%以上、98%以上、98.5%以上、99%以上である。

[0041] 配列表の配列番号1に示したアミノ酸配列において、アミノ酸が置換、挿入、欠失、付加される場所は特に制限されないが、好ましくは配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列のうち、2、22、25、39、42、45、51、56、71、87、90、102、109、124、135、138、155、159、175、177、183、190、195、212、220、226、228、236、238、250、254、257、259、265、267、270、279、298、300、301、および331番目から選択される1つもしくは複数のアミノ酸置換が導入されているポリペプチドであることが好ましい。

[0042] さらに好ましくは、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において次の群；2番目がイソロイシン、22番目がアルギニン、25番目がフェニルアラニン、39番目がアルギニン、42番目がアルギニン、45番目がアスパラギン酸、51番目がアラニン、56番目がリジン、71番目がアスパラギンもしくはアルギニン、87番目がイソロイシン、90番目がグリシン、102番目がイソロイシン、109番目がグリシン、124番目がロイシン、135番目がアラニン、138番目がアスパラギン、155番目がロイシンもしくはアルギニン、159番目がフェニルアラニン、175番目がアスパラギン酸、177番目がフェニルアラニン、183番目がスレオニン、190番目がセリン、195番目がロイシン、212番目がフェニルアラニン、ス

レオニンもしくはチロシン、220番目がバリン、226番目がグリシン、228番目がバリン、236番目がアスパラギン、238番目がイソロイシン、250番目がプロリン、254番目がアスパラギン、257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、267番目がプロリン、270番目がメチオニン、279番目がアルギニン、298番目がプロリン、300番目がアスパラギン酸、301番目がシステイン、および331番目がフェニルアラニンに置換、から選択される1つ以上のアミノ酸に、アミノ酸置換が導入されているポリペプチドである。

[0043] また、本発明のポリペプチドは、有機溶剤に対する安定性の向上の観点から、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において次の群；2番目がイソロイシン、45番目がアスパラギン酸、71番目がアスパラギンもしくはアルギニン、102番目がイソロイシン、124番目がロイシン、175番目がアスパラギン酸、177番目がフェニルアラニン、183番目がスレオニン、195番目がロイシン、220番目がバリン、226番目がグリシン、236番目がアスパラギン、238番目がイソロイシン、257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、267番目がプロリン、270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、および301番目がシステインに置換、から選択される1つ以上のアミノ酸置換が導入されていることが好ましい。

[0044] さらに、下記の(1)～(35)；配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列において下記の(1)～(35)；

- (1) 71番目がアスパラギン、195番目がロイシン、
- (2) 71番目がアルギニン、259番目がグルタミン酸、
- (3) 71番目がアルギニン、270番目がメチオニン、
- (4) 71番目がアルギニン、300番目がアスパラギン酸、
- (5) 102番目がイソロイシン、270番目がメチオニン、
- (6) 177番目がフェニルアラニン、220番目がバリン、
- (7) 226番目がグリシン、270番目がメチオニン、

- (8) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、
- (9) 257番目がセリン、270番目がメチオニン、
- (10) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (11) 259番目がグルタミン酸、300番目がアスパラギン酸、
- (12) 267番目がプロリン、270番目がメチオニン、
- (13) 270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、
- (14) 2番目がイソロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (15) 45番目がアスパラギン酸、175番目がアスパラギン酸、183番目がスレオニン、
- (16) 102番目がイソロイシン、226番目がグリシン、267番目がプロリン、
- (17) 124番目がロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (18) 177番目がフェニルアラニン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (19) 220番目がバリン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (20) 236番目がアスパラギン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (21) 238番目がイソロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (22) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (23) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、300番目がアスパラギン酸、
- (24) 259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、270番目がメチオニン、

(25) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、

(26) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、301番目がシステイン、

(27) 2番目がイソロイシン、238番目がイソロイシン、

(28) 71番目がアスパラギン、195番目がロイシン、

(29) 109番目がグリシン、331番目がフェニルアラニン、

(30) 124番目がロイシン、236番目がアスパラギン、

(31) 159番目がフェニルアラニン、259番目がグルタミン酸、

(32) 42番目がアルギニン、155番目がアルギニン、279番目がアルギニン、

(33) 45番目がアスパラギン酸、175番目がアスパラギン酸、183番目がスレオニン、

(34) 155番目がロイシン、250番目がプロリン、298番目がプロリン、および

(35) 56番目がリジン、138番目がアスパラギン、190番目がセリン、254番目がアスパラギンに置換されるアミノ酸置換から選択されるアミノ酸置換が導入されているポリペプチドであることがより好ましい。

[0045] また、本発明のポリペプチドは、有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性の向上の観点から、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列のうち次の群；2番目がアルギニン、39番目がアルギニン、51番目がアラニン、87番目がイソロイシン、90番目がグリシン、259番目がグルタミン酸、および270番目がメチオニンに置換されるアミノ酸置換、から選択される1つ以上のアミノ酸置換が導入されていることが好ましい。

[0046] さらに、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列に下記の(1)～(7)；

(1) 22番目がアルギニン、

(2) 22番目がアルギニン、87番目がイソロイシン、

- (3) 39番目がアルギニン、
- (4) 39番目がアルギニン、51番目がアラニン、
- (5) 51番目がアラニン、
- (6) 87番目がイソロイシン、および
- (7) 90番目がグリシンに置換されるアミノ酸置換

のいずれかで示されるアミノ酸置換が導入されていることがより好ましい。

[0047] 有機溶剤としては、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、2-プロパノール、酢酸エチル、トルエン、メタノール、エタノール、n-ブタノール、ヘキサン、アセトニトリル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、アセトン、ジメトキシプロパン、t-メチルブチルエーテル、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジグリム、エチレングリコール、ジメトキシエタン、四塩化炭素、塩化メチレン、エチルセロソルブ、酢酸セロソルブ、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、または、ヘキサメチルリン酸トリアミドなどであることが好ましく、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、2-プロパノール、酢酸エチル、トルエン、酢酸ブチル、または、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノンであることがより好ましく、ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシドまたは2-プロパノールであることがさらに好ましい。

[0048] 本発明の酵素は、有機溶剤存在下でもカルボニル化合物に対する反応性が高い。有機溶剤存在下とは、酵素を含む液体と有機溶剤が混合している状態でも良いが、酵素を含む液体と有機溶剤が不均一な状態でも良く、これを物理的に攪拌し、混合した状態でも良い。

[0049] 「有機溶剤存在下で反応性の高い酵素」とは、配列表の配列番号1に記載の野生型酵素と比較して、前記有機溶剤存在下で一定時間処理した後、もしくは、前記有機溶剤存在下で2-ペンタノンに対する酵素の還元活性が高いことを示す。好ましくは有機溶剤に対する酵素の安定性が高い、もしくは有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が高い酵素である。

[0050] 「有機溶剤に対する安定性が向上している」とは、具体的には、酵素を有機

溶剤とインキュベートした後で、2-ペンタノンまたは2-ヘキサノンに対する残存活性を後述の実施例4または5に記載する方法で測定した場合に、野生型酵素と比較して残存活性が1%以上高いことであり、好ましくは5%以上、さらに好ましくは10%以上、もっとも好ましくは20%以上高いことをいう。

[0051] また、「有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上している」とは、具体的には、有機溶剤存在条件下での2-ヘキサノンに対する相対活性を後述の実施例31に記載する方法で測定した場合に、野生型酵素と比較して相対活性が1%以上高いことであり、好ましくは5%以上、より好ましくは7%以上、さらに好ましくは10%以上、最も好ましくは20%以上高いことをいう。

[0052] 有機溶剤に対する酵素の安定性は、例えば、以下の方法で評価できる。

[有機溶剤に対する酵素の安定性の評価方法]

酵素を含む無細胞抽出液に任意の濃度（例えば0.5%～50%）の有機溶剤を含む緩衝液（好ましくはpH5～8の0.01～1Mリン酸緩衝液）を加えて任意の温度（例えば4～40℃）でインキュベートする。有機溶剤と緩衝液が不均一な場合は振とう、または攪拌しながらインキュベートする。有機溶剤を非添加のサンプルと有機溶剤を添加した処理液を0.1～48時間後にサンプリングし、それを0.1Mのリン酸カリウム水溶液（pH7.0）で希釈し、その希釈液を用いて下記の「カルボニル化合物に対する還元能力の評価方法」で酵素の活性を測定する。相対活性は下記式で算出することができる。

相対活性（%）＝〔溶剤添加条件での酵素活性〕÷〔溶剤非添加条件での酵素活性〕×100

[0053] 配列表の配列番号1に記載のカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤に対する安定性が向上している改変型カルボニル還元酵素とは、上記の評価を行なった場合の残存活性が、野生型に比べて1%以上高い酵素であり、好ましくは5%以上、さらに好ましくは10%以上、最も好ましくは20%以上高

い酵素である。

[0054] [カルボニル化合物に対する還元能力の評価方法]

100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) にNADPHもしくは還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (以下、NADH) 0.25 mM、還元活性を評価したいカルボニル化合物 (例えば2-ペンタノン、2-ヘキサノン、2,3-ブタンジオン) 1~50 mMおよび本発明のポリペプチドを含む反応液を30℃で反応させ、NADPHもしくはNADH量の減少に伴う波長340 nmの吸光度の減少を測定することにより、還元反応の進行を容易に評価することができる。吸光度が減少した場合、本発明のペプチドは評価対象のカルボニル化合物を還元する能力を有する、と判断することができる。なお、吸光度の減少速度が速いほど、評価対象のカルボニル化合物に対する還元能力が高いといえる。また、ポリペプチドの還元能力は数値化することも可能であり、還元活性1 Uは1分間に1 μmolのNADPHの消費を触媒する酵素量とした。

[0055] また、有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性は、例えば、以下の方法のように決定することができる。

[有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性の評価方法1]

100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.5) にNADPHもしくは還元型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチド (以下、NADH) 3 mM、還元活性を評価したいカルボニル化合物 (例えば2-ペンタノン、2-ヘキサノン、2,3-ブタンジオン) 1%、有機溶剤0.01~60% (v/v) または有機溶剤非添加、および本発明のポリペプチドを含む反応液を30℃で0.01~5時間反応させ、ガスクロマトグラフィーなどにより分析し、カルボニル化合物からアルコールへの変換率を求める。

[0056] 相対活性は下記式で算出することができる。

$$\text{相対活性 (\%)} = [\text{有機溶剤存在下での変換率}] \div [\text{有機溶剤非存在下での変換率}] \times 100$$

[0057] 本明細書中で、配列表の配列番号1に記載のカルボニル還元酵素と比較して

、有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上している改変型カルボニル還元酵素とは、上記の評価を行った場合の残存活性が、野生型に比べて1%以上高いことであり、好ましくは5%以上、より好ましくは7%以上、さらに好ましくは10%以上、最も好ましくは20%以上高いことである。また、本発明の酵素は、配列表の配列番号1に記載のカルボニル還元酵素と比較して、熱安定性が高い。

[0058] 本発明の改変型カルボニル還元酵素は、下記の方法により探索することができる。

エラープローンPCR法 (Leung et al., *Technique* 1, 11-15 (1989))、あるいは同様の原理に基づいたキットを用いて、配列表の配列番号2に示す塩基配列 (野生型酵素遺伝子) に1つ以上の塩基配列の置換、挿入、欠失、付加が導入されたDNA断片を得ることができる。例えば、野生型酵素遺伝子をテンプレートにし、定法により、240番目のTをCに置換し、野生型酵素のアミノ酸配列を変えずにNdeI認識部位を破壊できる (配列表の配列番号3)。これをテンプレートにプライマー1: 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、およびプライマー2: 5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5) とDiversify PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech社製) を用いて、野生型酵素をコードする遺伝子の全長にランダムに変異が導入され、かつ開始コドンにNdeI認識部位が付加され、終始コドンの直後にSaII認識部位が付加された複数種類の二本鎖DNA (変異型酵素遺伝子) を得ることができる。この増幅断片をNdeIおよびSaIIで消化し、プラスミドpUCN18 (PCR法によりpUC18 (タカラバイオ社製) の185番目のTをAに改変してNdeIサイトを破壊し、更に471-472番目のGCをTGに改変することにより新たにNdeIサイトを導入したプラスミド) のlacプロモーターの下流のNdeI認識部位とSaII認識部位

の間に挿入し、このプラスミドを用いてエシェリヒア・コリ (E s c h e r i c h i a c o l i) HB101株 (以下、E. c o l i HB101) を形質転換する。形質転換した大腸菌を100  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含むLBプレート培地に塗布し、シングルコロニーの大腸菌を得る。また、野生型遺伝子の代わりに前記方法で得られた変異型酵素遺伝子を用いて、同様の操作でさらに変異を導入した変異酵素ライブラリーを作製することもできる。

[0059] 上記ライブラリーから、本発明の改変型カルボニル還元酵素を選抜することができる。選抜方法としては特に限定されないが、好ましくは下記の方法である。

[有機溶剤に対する安定性が向上した酵素のプレート評価による選抜法1]  
変異酵素ライブラリーの各組換え菌および野生型酵素を生産する組換え菌 (例えば、参考例3に示すE. c o l i HB101 (pNKP)) を適当な培地 (例えば200  $\mu$ g/mLのアンピシリンを含む2×YT培地 (トリプトン1.6%、イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム 0.5%、pH 7.0)) に接種し、37°Cで24時間振盪培養する。得られた各培養液を菌体破碎処理し、遠心分離後、沈殿を除去し、無細胞抽出液を得る。各酵素を含む無細胞抽出液に適当な濃度の有機溶剤 (好ましくは終濃度10~30%のジメチルホルムアミド) を含む緩衝液 (好ましくはpH5~8の0.01~1Mリン酸緩衝液) を加えて適当な温度 (例えば4~40°C) でインキュベートする。0.1~48時間程度インキュベートした後、処理した各無細胞抽出液を96穴プレート (AGCテクノグラス社製) に分注し、NADPH (好ましくは1.5mM) とカルボニル化合物 (好ましくは10mMの2,3-ブタンジオン) を含むリン酸緩衝液 (pH5~7) を加えて、10~40°Cで反応する。経時的にUVサンプル撮影装置FAS-III (東洋紡績社製) でNADPHの蛍光を観察する。この時、反応が進行しない酵素液はNADPHの蛍光が残存するが、反応が進行した無細胞抽出液はNADPHの減少に伴い、蛍光がなくなる。対照である野生型酵素に比べ、短時間

で蛍光がなくなった酵素を塩化物に対する安定性が向上した酵素として選抜した。選抜した酵素の培養液からプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズジャパン社製) およびApplied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズジャパン社製) を用いて改変型カルボニル還元酵素遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定することができる。

- [0060] [有機溶剤に対する安定性が向上した酵素のプレート評価による選抜法2] 変異酵素ライブラリーの各組換え菌および野生型酵素を生産する菌 (例えば、参考例3に示す *E. coli* HB101 (pNKP)) を適当な培地) を適当な寒天培地 (例えば、100  $\mu$ g/mL のアンピシリンを含むLBプレート培地) に植菌し、30°C で24時間培養する。得られたコロニーをナイロン膜 (Biodyne A、0.45  $\mu$ m) に転写した後、そのナイロン膜を有機溶剤 (好ましくは40%のジメチルホルムアミド) を含むバッファ (好ましくは50mMの3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) バッファ) 中に0.1分~24時間浸漬する。このバッファは40~80°C に加温されていることが好ましい。その後、このナイロン膜をNADP<sup>+</sup> (好ましくは1mM)、nitroblue tetrazolium (好ましくは200  $\mu$ M)、1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate (好ましくは10  $\mu$ M)、2-プロパノール (例えば0.1~50%) を含むバッファ (好ましくは50mMの3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) バッファ) 中に適当な温度 (例えば4~40°C) で0.1分~24時間浸漬する。その後、ナイロン膜を蒸留水で洗浄し、4染色されたコロニーを有機溶剤に対する安定性が向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌として選抜することができる。

- [0061] これらの組換え菌を適当な液体培地 (例えば、200  $\mu$ g/mL のアンピシ

リンを含む2×YT培地（トリプトン1.6%、イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.0）に接種し、37℃で20時間振盪培養する。得られた各培養液について、遠心分離により菌体を集め、バッファ（好ましくは50mMの3-（N-morpholino）propanesulfonic acid（MOPS）バッファ）に懸濁する。これをUH-50型超音波ホモゲナイザー（SMT社製）を用いて破碎した後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得る。

[0062] バッファ（好ましくは50mMの3-（N-morpholino）propanesulfonic acid（MOPS）バッファ）とジメチルホルムアミドの混合液を、ジメチルホルムアミドの終濃度が好ましくは0.1~60%になるように各無細胞抽出液に加え、加温（好ましくは40~80℃で0.1分~24時間）したのち、氷冷する。これに、NADP<sup>+</sup>（好ましくは1mM）、nitroblue tetrazolium（好ましくは200μM）、1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfate（好ましくは10μM）、2-プロパノール（例えば0.1~50%）を含むバッファ（好ましくは50mMの3-（N-morpholino）propanesulfonic acid（MOPS）バッファ）を混合し、96穴プレート（AGCテクノグラス社製）に移して観察する。染色されたものを有機溶剤に対する安定性がより向上した改変型カルボニル還元酵素として選抜することができる。

[0063] 選抜した組換え菌の培養液からプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズジャパン社製）およびApplied Biosystems 3130x1ジェネティックアナライザ（アプライドバイオシステムズジャパン社製）を用いて変異型RKP遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定することができる。

[0064] [有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した酵素のプレート評価による選抜法]

変異酵素ライブラリーの各組換え菌および野生型酵素を生産する菌（例えば、参考例3に示す *E. coli* HB101 (pNKP)）を適当な寒天培地（例えば、 $100\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含むLBプレート培地）に植菌し、 $30^\circ\text{C}$ で24時間培養する。得られたコロニーをナイロン膜（Biodyne A、 $0.45\ \mu\text{m}$ ）に転写した後、 $\text{NADP}^+$ （好ましくは $1\ \text{mM}$ ）、nitroblue tetrazolium（好ましくは $200\ \mu\text{M}$ ）、1-methoxy-5-methylphenazinium methyl sulfate（好ましくは $10\ \mu\text{M}$ ）、2-プロパノール（例えば $0.1\sim 50\%$ ）と有機溶剤（好ましくは $0.1\sim 80\%$ のジメチルホルムアミド）含むバッファー（好ましくは $50\ \text{mM}$ の3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) バッファー）中に適当な温度（例えば $4\sim 40^\circ\text{C}$ ）で $0.1\text{分}\sim 10\text{時間}$ 浸漬する。その後、ナイロン膜を蒸留水で洗浄し、染色されたコロニーを有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌の候補として選抜することができる。

[0065] これらの組換え菌を適当な液体培地（例えば、 $200\ \mu\text{g}/\text{ml}$ のアンピシリンを含む $2\times\text{YT}$ 培地（トリプトン $1.6\%$ 、イーストエキス $1.0\%$ 、塩化ナトリウム $0.5\%$ 、 $\text{pH}7.0$ ））に接種し、 $37^\circ\text{C}$ で20時間振盪培養する。得られた各培養液を菌体破碎処理し、遠心分離後、沈殿を除去し、無細胞抽出液を得る。無細胞抽出液に $\text{NADPH}$ （好ましくは $0.625\ \text{M}$ ）、カルボニル化合物（好ましくは $10\ \text{mM}$ の2,3-ブタンジオン）、有機溶剤（好ましくは $0.1\sim 80\%$ のジメチルホルムアミド）を溶解したバッファー（好ましくは $0.1\ \text{M}$ のリン酸バッファー（ $\text{pH}6.5$ ））を混合する。これを96穴プレート（アサヒテクノグラス社製）に分注し、継時的にBenchmark Plus microplate spectrophotometer（BIO-RAD社製）で $\text{NADPH}$ の蛍光を観察する。反応が進行しない酵素液は $\text{NADPH}$ の蛍光が残存するが、反応が進行した無細胞抽出液は $\text{NADPH}$ の減少に伴い、蛍光が無くなる。カルボニ

ル化合物の還元によってNADPHが消費され、短時間で蛍光がなくなったものを有機溶剤に対する反応阻害に対する抵抗性がさらに向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌として選抜する。

[0066] 選抜した組換え菌の培養液からプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズジャパン社製) およびApplied Biosystems 3130x1ジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズジャパン社製) を用いて変異型RKP遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定することができる。

[0067] 有機溶剤存在下でカルボニル化合物に対する反応性を高めることのできる、および／または熱安定性を高めることのできる複数の変異を、部位特異的変異導入によって組み合わせることによって、複数の変異の性質を併せ持つ改変型カルボニル還元酵素を作製できる。

[0068] 本発明のポリヌクレオチドは、本発明のポリペプチドをコードするものであれば特に限定されないが、例えば、配列表の配列番号2に示した野生型酵素をコードする塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはこれに改変を加えて得られるポリペプチドが挙げられる。

[0069] 野生型酵素遺伝子の改変方法としては、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausubel, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1989)) 等に記載の公知の方法を用いることができる。すなわち、野生型酵素遺伝子の塩基の1個、または複数個 (例えば、40個、好ましくは20個、より好ましくは10個、さらに好ましくは5個、4個、3個、または2個の塩基) を置換、付加、挿入もしくは欠失することにより、野生型酵素のアミノ酸配列を改変したポリヌクレオチドを作製することができる。例えば、エラープライムPCR法 (Leung et al., Technique 1, 11-15 (1989)) などのPCRを用いた変異導入法や、あるいは市

販のキットDiversify PCR Random Mutagenesis Kit (Clontech社製)、Transformer Mutagenesis Kit (Clontech社製)、EXOIII/Mung Bean Deletion Kit (Stratagene社製)、QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社製)などの利用が挙げられる。

[0070] ポリヌクレオチドを部位特異的変異導入法により作製する場合、部位特異的変異導入法としては、例えば、Olfert Landtら (Gene, 96, 125-128 (1990))、Smithら (Genetic Engineering, 3, 1, Setlow, J. Plenum Press)、Vlasukら (Experimental Manipulation of Gene Expression, Inouye, M. Academic Press)、Hos. N. Huntら (Gene, 77, 51 (1989))の方法やQuickChange II Kit (ストラタジーン社製)の市販キットの利用等があげられる。なお、2箇所に変異を導入する場合には上記方法に準じた方法を2回繰り返すことにより、目的とする本発明ポリヌクレオチドを得ることができる。尚、複数の他のポジションが他のアミノ酸で置換されている場合も当該方法により、目的とする本発明ポリヌクレオチドを得ることができる。

[0071] 本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドとしては、例えば、2-ペンタノン還元して2-ペンタノールを生成する活性を有し、配列表の配列番号1に示すアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤存在下でカルボニル化合物に対する反応性が高いポリペプチドをコードし、かつ、配列表の配列番号2に示した塩基配列からなるポリヌクレオチドと相補的な塩基配列を含むポリヌクレオチドと、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドが好ましい。

[0072] ここで、「配列表の配列番号2に示したポリヌクレオチドと相補的な塩基配

列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、配列表の配列番号2に示した塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして、ストリンジェントな条件下にコロニー・ハイブリダイゼーション法、プラーク・ハイブリダイゼーション法、あるいはサザンハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるポリヌクレオチドを意味する。

[0073] ハイブリダイゼーションは、Molecular Cloning 2nd Edition (Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))等に記載されている方法に準じて行うことができる。ここで、「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチド」とは、例えば、コロニーあるいはプラーク由来のポリヌクレオチドを固定化したフィルターを用いて、0.7~1.0Mの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーションを行った後、3倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mM塩化ナトリウム、15mMクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃の条件下でフィルターを洗浄することにより取得できるDNAをあげることができる。より好ましくは65℃で1倍濃度のSSC溶液で洗浄、さらに好ましくは65℃で0.7倍濃度のSSC溶液で洗浄、更に好ましくは65℃で0.5倍、0.45倍、0.25倍、0.2倍、0.15倍濃度のSSC溶液で洗浄することにより取得できるポリヌクレオチドである。

[0074] 以上のようにハイブリダイゼーション条件を記載したが、これらの条件に特に制限されない。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーに影響する要素としては温度や塩濃度など複数の要素が考えられ、当業者であればこれら要素を適宜選択することで最適なストリンジェンシーを実現することが可能である。

[0075] 上記の条件にてハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、配列番号2に示されるポリヌクレオチドとの配列同一性が、好ましくは78%以上、より好ましくは84%以上、さらに好ましくは87%以上、さらに好ましく

は89%、90%、94%、95%、97%以上のポリヌクレオチドを挙げることができ、コードされるポリペプチドが、本発明のポリペプチドの性質を有する限り、上記ポリヌクレオチドに包含される。

[0076] 本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを発現ベクターに挿入することにより、ポリペプチド発現ベクターを作製できる。

[0077] 上記で用いる発現ベクターとしては、適当な宿主生物内で当該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを発現できるものであれば、特に限定されない。このようなベクターとしては、例えば、プラスミドベクター、ファージベクター、コスミドベクターなどが挙げられ、さらに、他の宿主株との間での遺伝子交換が可能なシャトルベクターも使用できる。

[0078] このようなベクターは、例えば大腸菌の場合では、通常、*lacUV5* プロモーター、*trp* プロモーター、*trc* プロモーター、*tac* プロモーター、*lpp* プロモーター、*tufB* プロモーター、*recA* プロモーター、*pL* プロモーター等の制御因子を含み、本発明のDNAと作動可能に連結された発現単位を含む発現ベクターとして好適に使用できる。例えば、*pUCN18* (参考例2参照)、*pSTV28* (タカラバイオ社製)、*pUCNT* (国際公開第94/03613号)などが挙げられる。

[0079] 本明細書で用いる用語「制御因子」は、機能的プロモーターおよび、任意の関連する転写要素(例えばエンハンサー、CCAATボックス、TATAボックス、SP1部位など)を有する塩基配列をいう。

[0080] 本明細書で用いる用語「作動可能に連結」は、遺伝子の発現を調節するプロモーター、エンハンサー等の種々の調節エレメントと遺伝子が、宿主細胞中で作動し得る状態で連結されることをいう。制御因子のタイプおよび種類が、宿主に応じて変わり得ることは、当業者に周知の事項である。

[0081] 各種生物において利用可能なベクター、プロモーターなどに関して微生物学基礎講座(8、安藤忠彦、共立出版、(1987))などに詳細に記述されている。

[0082] ベクターは、還元型補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌ

クレオチドをさらに含んでも良い。還元型補酵素再生能を有するポリペプチドとしては、例えば、グルコース脱水素酵素が挙げられる。

[0083] ベクターにより宿主細胞を形質転換することにより、形質転換体を得ることができる。或いは、形質転換体として、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを染色体中に導入して得られる形質転換体も挙げられる。

[0084] ベクターにより形質転換するための宿主細胞としては、各ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むポリペプチド発現ベクターにより形質転換され、導入したポリヌクレオチドがコードするポリペプチドを発現することができる細胞であれば、特に制限されない。宿主細胞として利用可能な微生物としては、例えば、Escherichia 属、Bacillus 属、Pseudomonas 属、Serratia 属、Brevibacterium 属、Corynebacterium 属、Streptococcus 属、および Lactobacillus 属など宿主ベクター系の開発されている細菌、Rhodococcus 属および Streptomyces 属など宿主ベクター系の開発されている放線菌、Saccharomyces 属、Kluyveromyces 属、Schizosaccharomyces 属、Zygosaccharomyces 属、Yarrowia 属、Trichosporon 属、Rhodospiridium 属、Pichia 属、および Candida 属などの宿主ベクター系の開発されている酵母、Neurospora 属、Aspergillus 属、Cephalosporium 属、および Trichoderma 属などの宿主ベクター系の開発されているカビ、などが挙げられる。また、微生物以外で

も、植物、動物において様々な宿主・ベクター系が開発されており、特に蚕を用いた昆虫（Nature, 315, 592-594 (1985)）や菜種、トウモロコシ、ジャガイモなどの植物中に大量に異種タンパク質を発現させる系が開発されており、好適に利用できる。これらのうち、導入および発現効率から細菌が好ましく、大腸菌が特に好ましい。

[0085] 本発明のベクターは、公知の方法により宿主微生物に導入できる。例えば、ポリペプチド発現ベクターとして前記の発現ベクター pUCN18 に改変型カルボニル還元酵素をコードするポリヌクレオチドを導入した本発明のプラスミド（実施例 2～3、6～15、17～27、30 に示す pNKPM01～53）を、宿主微生物として大腸菌を用いる場合は、市販の E. coli HB101 コンピテントセル（タカラバイオ社製）などを用いて、そのプロトコールに従って操作することにより、当該ベクターを宿主細胞に導入した形質転換体（例えば、実施例 27 に示す E. coli HB101 (pNKPM50)）が得られる。

[0086] また、本発明のポリペプチドおよび後述する還元型補酵素再生能を有するポリペプチドの両ポリペプチドを、同一菌体内で発現させた形質転換体も育種することができる。すなわち、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドおよび還元型補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、同一のベクターに組み込み、これを宿主細胞に導入することにより得られる他、これら 2 種類の DNA を不和合性グループの異なる 2 種のベクターにそれぞれ組み込み、それらを同一の宿主細胞に導入することによっても得られ得る。

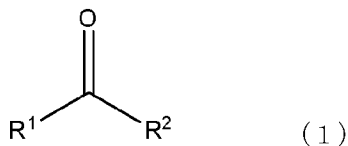
[0087] このようにして得られる形質転換体としては、例えば、改変型カルボニル還元酵素をコードするヌクレオチドを前記の発現ベクター pUCN18 に導入した組換えベクター（例えば、実施例 2 に示した pNKPM01）と還元型補酵素再生能を有するポリペプチドであるグルコース脱水素酵素をコードするポリヌクレオチドを含むベクター、E. coli HB101 コンピテントセル（タカラバイオ社製）に導入した形質転換体などが挙げられる。

[0088] 本発明のポリペプチドもしくは形質転換体および／またはその処理物を、カルボニル化合物に作用させることにより、アルコール化合物を製造することができる。

[0089] 基質となるカルボニル化合物は特に制限されない。カルボニル化合物の中でも、非対称ケトンは、その還元産物が有用な光学活性アルコールとなるため、好ましい。

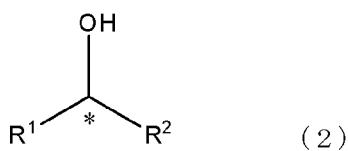
[0090] 前記カルボニル基を有する化合物としては、例えば、下記式（１）：

[化3]



（式中、 $\text{R}^1$ および $\text{R}^2$ は水素原子、ハロゲン原子、置換されていても良いアルキル基、置換されていても良いアラルキル基、置換されていても良いアリアル基、置換されていても良いアルコキシ基、アミノ基、またはニトロ基であるか、もしくは、 $\text{R}^1$ と $\text{R}^2$ が互いに結合し環を形成しても良い。但し、 $\text{R}^1$ と $\text{R}^2$ は構造が異なる）で表される非対称ケトンが挙げられ、その生成物としては、例えば、下記式（２）：

[化4]



（式中、 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ は前記と同じ、\*は不斉炭素を表す）で表される光学活性アルコールが挙げられる。

[0091] 前記 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ は炭素数１～１４のアルキル基、炭素数６～１４のアリール基、炭素数４～１４のヘテロアリール基、炭素数１～５のアルコキシ基、炭素数２～５のアルコキシカルボキシル基、炭素数１～５の直鎖もしくは分岐鎖アルキル基、炭素数２～５のアルケニル基、炭素数５～１０のシクロアルキル基、炭素数４～９のヘテロシクロアルキル基、カルボキシル基、水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、アミノ基、またはニトロ基が好ましい。

- [0092] なお、上記で言う置換されていても良いとは、置換基を有していても良いという意味であり、置換基として、ハロゲン原子、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、シアノ基、ニトロ基、アルキル基、アリール基、アラルキル基、またはアルコキシ基などが挙げられる。また、ハロゲン原子として、フッ素原子、塩素原子、臭素原子、ヨウ素原子などが挙げられる。
- [0093] 具体的なカルボニル化合物として、2-ペンタノン、2-ヘキサノン、2,3-ブタンジオン、アセトフェノン、(S)-1-(4-フルオロフェニル)-5-(2-オキソ-4-フェニルオキサゾリジン-3-イル)-ペンタン-1,5-ジオン、プロピオフェノン、n-ブチロフェノン、バレロフェノン、ヘキサノフェノン、1-フェニル-2-ブタノン、ベンジルアセトン、2,5-ヘキサジオン、2,3-ヘキサジオン、3,4-ヘキサジオン、フェノキシ-2-プロパノンが挙げられる。
- [0094] 本発明のポリペプチドを使用して生産されるアルコール化合物として、2-ペンタノール、2-ヘキサノール、2,3-ブタンジオール、3-ヒドロキシ-2-ブタノン、1-フェニルエチルアルコール、[3-[(5R)-[4-フルオロフェニル]-5-ヒドロキシペンタノイル]-4S)-フェニル-1,3-オキサゾリジン-2-オン、1-フェニル-1-プロパノール、1-フェニル-1-ブタノール、1-フェニル-1-ペンタノール、1-フェニル-1-ヘキサノール、1-フェニル-2-ブタノール、4-フェニル-2-ブタノール、2,5-ヘキサジオール、5-ヒドロキシ-2-ヘキサノン、2,3-ヘキサジオール、2-ヒドロキシヘキサン-3-オン、3-ヒドロキシ-2-ヘキサノン、3,4-ヘキサジオール、4-ヒドロキシ-3-ヘキサノン、1-フェノキシ-2-プロパノールが挙げられる。
- [0095] 本発明のポリペプチドもしくは本発明のポリペプチドを発現させた形質転換体および／またはその処理物を用いて、前記カルボニル基を有する化合物を還元してアルコールを製造する場合、以下のように実施され得る。但し、以下の方法に限定されるわけではない。

- [0096] 適当な溶媒（例えば100mMリン酸緩衝液（pH6.5）など）、カルボニル化合物である基質（例えば、2-ペンタノンもしくはアセトフェノン）を加え、NADPHや酸化型ニコチンアミド・アデニンジヌクレオチドリン酸（以下、NADP<sup>+</sup>）等の補酵素、および該形質転換体の培養物および／またはその処理物などを添加し、pH調整下、攪拌して反応させる。
- [0097] ここで、処理物とは、例えば、粗抽出液、培養菌体、凍結乾燥生物体、アセトン乾燥生物体、菌体破砕物、またはそれらの固定化物等で、該ポリペプチドの酵素触媒活性が残存している物を意味する。
- [0098] 反応温度は5～80℃であることが好ましく、10～60℃であることがより好ましく、20～40℃であることがさらに好ましい。反応液のpHは3～10であることが好ましく、pH4～9であることがより好ましく、pH5～8であることがさらに好ましい。反応はバッチ式あるいは連続方式で行われ得る。バッチ方式の場合は、反応基質は0.01～100%（w/v）、好ましくは0.1～70%（w/v）、より好ましくは0.5～50%（w/v）の仕込み濃度で添加されうる。また、反応の途中で新たに基質を追加添加しても良い。
- [0099] また、反応には水系溶媒を用いても良いし、水系の溶媒と有機系の溶媒とを混合して用いても良い。有機系溶媒としては、例えばジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、2-プロパノール、酢酸エチル、トルエン、メタノール、エタノール、n-ブタノール、ヘキサン、アセトニトリル、酢酸プロピル、酢酸ブチル、アセトン、ジメトキシプロパン、t-メチルブチルエーテル、ジエチルエーテル、ジイソプロピルエーテル、ジオキサン、テトラヒドロフラン、ジメチルアセトアミド、ジグリム、エチレングリコール、ジメトキシエタン、四塩化炭素、塩化メチレン、エチルセロソルブ、酢酸セロソルブ、1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン、ヘキサメチルリン酸トリアミド等が挙げられる。反応系に含まれる有機系溶媒の濃度は、特に限定されないが、好ましくは1～95%、より好ましくは5～90%、さらに好ましくは10～80%である。

- [0100] ここで形質転換体の処理物等とは、例えば、無細胞抽出液、培養菌体、凍結乾燥菌体、アセトン乾燥菌体、あるいはそれらの磨砕物、これらの混合物などを意味する。更にそれらは、ポリペプチド自体あるいは菌体のまま公知の手段で固定化されて用いられ得る。
- [0101] また、反応を行う際に、本発明のポリペプチド、および還元型補酵素再生能を有するポリペプチドの両者を生産する形質転換体を用いれば、補酵素の使用量を大幅に減らすことが可能となる。還元型補酵素再生能を有するポリペプチドについて、次に詳述する。
- [0102] 本発明のポリペプチドの生産能を有する形質転換体を用いて、カルボニル化合物を還元してアルコール化合物を合成する場合、補酵素としてNADPHもしくはNADHが必要となる。上記のように、反応系にNADPHもしくはNADHを必要な量だけ添加しても還元反応を実施しうる。しかし、酸化された該補酵素（NADP<sup>+</sup>やNAD<sup>+</sup>）を還元型NADPHやNADHに変換する能力（以後還元型補酵素再生能力と呼ぶ）を有する酵素とその基質からなる補酵素再生系を、本発明のポリペプチドと組み合わせて反応を行うことにより、高価な補酵素の使用量を大幅に削減することができる。還元型補酵素再生能力を有する酵素としては、ヒドロゲナーゼ、ギ酸脱水素酵素、カルボニル還元酵素、グルコース-6-リン酸脱水素酵素およびグルコース脱水素酵素等を用いることができる。好適には、グルコース脱水素酵素が用いられる。
- [0103] このような反応は、補酵素再生系を不斉還元反応系内に添加することによっても行われ得るが、本発明の酵素をコードするポリヌクレオチドおよび還元型補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの両者により形質転換された形質転換体を触媒とした場合は、還元型補酵素再生能を有する酵素を別に調製し反応系内に添加しなくても、効率的に反応を行うことができる。このような形質転換体は、先述の形質転換体の作製方法により得られる。
- [0104] 反応後の反応液からのアルコールの回収方法は特に限定されないが、反応液

から直接、または必要に応じて菌体等を分離後、酢酸エチル、トルエン、*t*-ブチルメチルエーテル、ヘキサン、塩化メチレン等の溶剤で抽出し、脱水後、蒸留、再結晶あるいはシリカゲルカラムクロマトグラフィー等により精製することができる。この方法により高純度のアルコール化合物を容易に得ることができる。

### 実施例

[0105] 以下、実施例で本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらにより限定されるものではない。なお、以下の実施例において用いた組み換えDNA技術に関する詳細な操作方法などは、次の成書に記載されている：

Molecular Cloning 2nd Edition (Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989))、Current Protocols in Molecular Biology (Frederick M. Ausubel, Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience (1989))。

[0106] (参考例1) ヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株由来カルボニル化合物還元活性を有するポリペプチド(野生型酵素)をコードするDNAの取得  
ヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株よりカルボニル化合物に対する還元活性を有するポリペプチド(以下、本ポリペプチドをRKPと呼ぶ)をコードするDNAをPCRにより取得した。

[0107] [ヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ NBRC0996株の染色体DNAの調製]

500ml容坂口フラスコに、バクトトリプトン16g、酵母エキス10g、塩化ナトリウム5g、アデカノールLG-109(日油社製)0.1g(いずれも1L当たり)の組成からなる液体培地(pH7)50mlを調製し

、120℃で20分間蒸気殺菌をおこなった。この培地に、予め同培地にて前培養しておいたヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株の培養液を5ml接種し、30℃で18時間振盪しながら培養を行った。この培養液から、Murray等の方法 (Nucl. Acids Res. 8, 4321 (1980)) に記載の方法に従って染色体DNAを抽出した。

[0108] [PCR反応]

プライマー1: 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー2: 5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5) を用いて、ヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (Vanderwaltozyma polyspora) NBRC0996株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行った。

[0109] その結果、配列表の配列番号2に示す塩基配列からなる遺伝子の開始コドン部分にNdeI 認識部位が付加され、かつ終始コドンの直後にSaII 認識部位が付加された二本鎖DNA (RKP遺伝子) が得られた。これを鋳型にさらにPCR反応を行い、定法により240番目のTをCに改変した。これによりこの遺伝子がコードするRKP酵素のアミノ酸配列は変わらずに、遺伝子中のNdeI 認識部位が破壊された配列表の配列番号3に示す塩基配列からなる二本鎖DNA (NdeI 部位を破壊したRKP遺伝子) が得られた。PCRは、DNAポリメラーゼとして、PrimeSTAR HS DNA polymerase (タカラバイオ社製) を用いて行い、反応条件はその取り扱い説明書に従った。

[0110] (参考例2) 組換えベクターpNKPの構築

参考例1で得られたNdeI 部位を破壊したRKP遺伝子をNdeI およびSaII で消化し、プラスミドpUCN18 (PCR法によりpUC18 (タカラバイオ社製) の185番目のTをAに改変してNdeI サイトを破壊し、更に471-472番目のGCをTGに改変することにより新たにNd

e | サイトを導入したプラスミド) の l a c プロモーターの下流の N d e | 認識部位と S a | | 認識部位の間に挿入し、組換えベクター p N K P を構築した。

[0111] (参考例3) ポリペプチドを発現する組換え生物の作製

参考例2で構築した組換えベクター p N K P を用いて、E. c o l i H B 1 0 1 コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換し、組換え生物 E. c o l i H B 1 0 1 ( p N K P ) を得た。また、p U C N 1 8 を用いて E. c o l i H B 1 0 1 コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換し、組換え生物 E. c o l i H B 1 0 1 ( p U C N 1 8 ) を得た。

[0112] (参考例4) 組換え生物におけるDNAの発現

参考例3で得た2種類の組換え生物 (E. c o l i H B 1 0 1 ( p U C N 1 8 )、E. c o l i H B 1 0 1 ( p N K P ) ) を、200  $\mu$  g / m l のアンピシリンを含む2  $\times$  Y T 培地 (トリプトン1.6%、イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.0) 5 m l に接種し、37  $^{\circ}$  C で24時間振盪培養した。上記の培養で得られたそれぞれ培養液について、遠心分離により菌体を集め、5 m l の100 m M リン酸緩衝液 (pH6.5) に懸濁した。これを、U H - 5 0 型超音波ホモゲナイザー (S M T 社製) を用いて破碎した後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。これら無細胞抽出液のアセトフェノン還元活性を測定した。アセトフェノンに対する還元活性は、100 m M リン酸緩衝液 (pH6.5) に、アセトフェノン10 m M、補酵素 N A D P H 0.25 m M、および無細胞抽出液を添加して30  $^{\circ}$  C で1分間反応を行い、波長340 n m における吸光度の減少速度より算出した。この反応条件において、1分間に1  $\mu$  m o l の N A D P H を N A D P に酸化する酵素活性を1 U と定義した。それぞれの組換え生物のアセトフェノン還元活性を以下に示す。E. c o l i H B 1 0 1 ( p U C N 1 8 ) については、アセトフェノン還元活性は0.1 U / m g 以下であった。一方、R K P を発現させた E. c o l i H B 1 0 1 ( p N K P ) のアセトフェノン還元活性は5 U / m g であった。以上のように、参考例

3で得られた組換え生物はアセトフェノンに対する還元活性を有し、R K Pの発現が認められた。

[0113] (参考例5) 野生型酵素R K Pの有機溶剤に対する安定性

参考例4と同様の方法で野生型酵素の無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液に終濃度30、40、50%のジメチルホルムアミドを添加し、硫酸もしくは水酸化ナトリウムでpH6.5に調整後、30℃で3時間インキュベートした。また、対照として何も添加しない無細胞抽出液も同様にインキュベートした。3時間後、各無細胞抽出液を希釈した。これら無細胞抽出液の2-ペンタノン還元活性を参考例4と同様の方法で測定した。下記式より溶剤添加時の相対活性を算出し、この値を各種化合物に対する安定性の指標とした。結果を表1に示す。

相対活性 (%) = [3時間目の酵素活性 (溶剤添加)] ÷ [3時間目の酵素活性 (溶剤非添加)] × 100

[0114] [表1]

添加溶剤	濃度	相対活性 (%)
非添加		100
ジメチルホルムアミド	30%	64
	40%	9
	50%	0
ジメチルスルホキシド	40%	91
	50%	58

[0115] 野生型酵素はジメチルスルホキシドに比べて、ジメチルホルムアミドに対する安定性が低かった。

[0116] (参考例6) 野生型酵素R K Pの有機溶剤に対する安定性

参考例4と同様の方法で野生型酵素の無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液に終濃度30%のジメチルホルムアミドを添加し、硫酸もしくは水酸化ナトリウムでpH6.5に調整後、30℃で2時間インキュベートした。また、対照として何も添加しない無細胞抽出液も同様にインキュベートした。2時間後、各無細胞抽出液を希釈した。これら無細胞抽出液の2-ヘキサノン還元活性を測定した。100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に、2-ヘキ

サノン 10 mM、補酵素 NADPH 0.25 mM、および無細胞抽出液を添加して 30°C で 1 分間反応を行い、波長 340 nm における吸光度の減少速度を測定した。この減少速度より 2-ヘキサノン還元活性を算出した。下記式より溶剤添加時の相対活性を算出し、この値を各種化合物に対する安定性の指標とした。溶剤添加条件下の野生型酵素の活性（相対活性）は溶剤非添加条件下の 8% であった。

相対活性 (%) = [2 時間目の酵素活性 (溶剤添加)] ÷ [2 時間目の酵素活性 (溶剤非添加)] × 100

[0117] (参考例 7) 野生型酵素 RKP の有機溶剤による反応阻害

参考例 4 と同様の方法で野生型酵素の無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液に終濃度 30% のジメチルホルムアミドを添加し、硫酸もしくは水酸化ナトリウムで pH 6.5 に調整後、30°C で 2 時間インキュベートした。また、対照として何も添加しない無細胞抽出液も同様にインキュベートした。2 時間後、各無細胞抽出液を希釈した。これら無細胞抽出液の 2-ヘキサノン還元活性を測定した。100 mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) に、30% ジメチルホルムアミド、2-ヘキサノン 10 mM、補酵素 NADPH 0.25 mM、および無細胞抽出液を添加して反応を行った。NADPH の蛍光の減少速度から NADPH の消費速度を求め、2-ヘキサノン還元活性を算出した。下記式より溶剤添加時の相対活性を算出し、この値を各種化合物に対する安定性の指標とした。溶剤添加条件下の野生型酵素の活性（相対活性）は溶剤非添加条件下の 24% であった。

相対活性 (%) = [酵素活性 (溶剤添加)] ÷ [酵素活性 (溶剤非添加)] × 100

[0118] (実施例 1) 変異酵素ライブラリーの作製 1

参考例 2 で作製した RKP 遺伝子を含むプラスミド pNKP をテンプレートに、プライマー 1 : 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号 4) およびプライマー 2 : 5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCT

TCA-3' (配列表の配列番号5) を用いてエラープロンPCR法 (Leung et al. Technique 1, 11-15 (1989)) を用いて、RKP遺伝子全長にランダムな変異を導入したDNA増幅断片を得た。この増幅断片を制限酵素NdeIおよびSalIで消化したのち、同酵素で処理した高発現ベクターpUCN18に組み込み、複数の変異酵素発現プラスミドを作製した。このプラスミドを用いてE. coli HB101を形質転換し、100 μg/mLのアンピシリンを含むLBプレート培地に塗布した。生育したコロニーは変異導入されたRKP遺伝子を有する組換え大腸菌であり、この組換え菌群を変異酵素ライブラリー1とした。

[0119] (実施例2) 改変型カルボニル還元酵素の選抜1

変異酵素ライブラリー1より有機溶剤に対する安定性が向上した改変型カルボニル還元酵素を選抜した。実施例1で作製した変異酵素ライブラリー1の各組換え菌および参考例3で作製したE. coli HB101 (pNKP) (対照) をそれぞれ参考例4と同様の方法で培養した。得られた各培養液60 μlに10 mM EDTA・2 Naおよび1% Triton X-100を含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) 240 μlを加え、37°Cで1時間インキュベートした。各処理液を遠心し、上清を無細胞抽出液とした。各無細胞抽出液200 μlに終濃度10~30%のジメチルホルムアミドを含むリン酸緩衝液 (pH 6.5) を加え、30°Cで2時間インキュベートした (ジメチルホルムアミド処理)。ジメチルホルムアミド処理した各無細胞抽出液を96穴プレート (AGCテクノグラス社製) に50 μl分注し、6 mMのNADPHを含むリン酸緩衝液 (pH 6.5) 50 μlと133 mM 2, 3-ブタンジオンを含むリン酸緩衝液 (pH 6.5) 100 μlを加え30°Cで反応した。経時的にUVサンプル撮影装置FAS-III (東洋紡績社製) でNADPHの蛍光を観察した。反応が進行しない酵素液はNADPHの蛍光が残存するが、反応が進行した無細胞抽出液はNADPHの減少に伴い、蛍光がなくなった。対照であるE. coli HB101 (pNKP) の無細胞抽出液 (野生型酵素) に比べ、早く蛍光がなくなった酵素をジメ

チルホルムアミド存在下で反応性の高い酵素、すなわち有機溶剤に対する安定性が向上した改変型カルボニル還元酵素として選抜した。選抜した酵素の培養液からプラスミドを抽出し、Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステムズジャパン社製) およびApplied Biosystems 3130x Iジェネティックアナライザ (アプライドバイオシステムズジャパン社製) を用いて変異型RKP遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定した。得られた有機溶剤に対する安定性の向上した改変型カルボニル還元酵素を表2に示す。

[0120] [表2]

プラスミド名称	変異部位
pNKPm01	T257S
pNKPm02	K259E
pNKPm03	S267P
pNKPm04	K270M
pNKPm05	N102I-E226G-S267P
pNKPm06	H71R-G300D

[0121] 表2に示す6種類の有機溶剤に対する安定性が向上した酵素を取得した。

[0122] (実施例3) 改変型カルボニル還元酵素の選抜2

変異酵素ライブラリー1より有機溶剤に対する安定性が向上した改変型カルボニル還元酵素を選抜した。実施例1で作製した変異酵素ライブラリー1の各組換え菌および参考例3で作製した*E. coli* HB101 (pNKP) (対照) を100 $\mu$ g/mLのアmpiシリンを含むLBプレート培地上に植菌した。得られたコロニーを40 $^{\circ}$ Cで加熱しておいたナイロン膜 (Bio dyne A、0.45 $\mu$ m) に転写した後、そのナイロン膜を30%のジメチルホルムアミドを含む50mMの3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) バッファー中に40 $^{\circ}$ Cで30分浸漬した。その後、このナイロン膜を1mMのNADP<sup>+</sup>、200 $\mu$ Mのnitroblue tetrazolium、10 $\mu$ Mの1-methoxy-5-methylphenazinium methylsulfateおよび10% (v/v) の2-プロパノールを含む50mMのMO

PSバッファー中に室温で30分浸漬した。その後、ナイロン膜を蒸留水で洗浄し、染色されたコロニーをジメチルホルムアミドに対する安定性が向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌候補として選抜した。候補株を200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  のアンピシリンを含む2×YT培地（トリプトン1.6%、イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム 0.5%、pH7.0）5 ml に接種し、20時間培養した。得られた各培養液について、遠心分離により菌体を集め、培養液の1/6量の100 mMリン酸緩衝液（pH6.5）に懸濁した。これを、UH-50型超音波ホモゲナイザー（SMT社製）を用いて破碎した後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液20  $\mu\text{l}$  に終濃度20、23、26、30%のジメチルホルムアミドと50 mM MOPSバッファー（pH7.0）を総液量が40  $\mu\text{l}$  になるように添加し、40°Cで30分間加熱した。氷上で1分間冷却した後、1 mMのNADP<sup>+</sup>、200  $\mu\text{M}$ のnitroblue tetrazolium、10  $\mu\text{M}$ の1-methoxy-5-methylphenazine methanesulfateおよび10%（v/v）の2-プロパノールを含む50 mMのMOPSバッファーを200  $\mu\text{l}$  加えた。反応液を96穴プレート（AGCテクノグラス社製）に移し、1時間観察した。染色されたものをジメチルホルムアミドに対する安定性がさらに向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌として選抜した。選抜した組換え菌の培養液からプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズジャパン社製）およびApplied Biosystems 3130x1ジェネティックアナライザ（アプライドバイオシステムズジャパン社製）を用いて変異型RKP遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定した。得られた有機溶剤に対する安定性の向上した改変型カルボニル還元酵素を表3に示す。

[0123]

[表3]

プラスミド名称	変異部位
pNKPm01	T257S
pNKPm02	K259E
pNKPm03	S267P
pNKPm04	K270M
pNKPm05	N102I-E226G-S267P
pNKPm06	H71R-G300D
pNKPm07	H71N-F195L
pNKPm08	L177F-A220V
pNKPm09	N45D-N175D-I183T
pNKPm10	K22R
pNKPm11	Y25F
pNKPm12	T135A
pNKPm13	Q155L
pNKPm14	F195L
pNKPm15	S212F
pNKPm16	S212T
pNKPm17	S212Y
pNKPm18	E228V
pNKPm19	N265K
pNKPm20	R301C
pNKPm21	S2I-V238I
pNKPm22	E109G-K331F
pNKPm23	I124L-S236N
pNKPm24	I159F-K259E
pNKPm25	L177F-A220V
pNKPm26	K42R-Q155R-K279R
pNKPm28	Q155L-S250P-Q298P
pNKPm29	E56K-T138N-T190S-D254N

[0124] 表3に示す29種類の有機溶剤に対する安定性が向上した酵素を取得した。

これらのうち6種類は実施例2で取得した酵素と同一の変異酵素だった。

[0125] (実施例4) 改変型カルボニル還元酵素の評価1

実施例2で取得した改変型カルボニル還元酵素の各組換え菌および参考例3で作製した *E. coli* HB101 (pNKP) (対照) をそれぞれ参考例4と同様の方法で培養した。得られた各培養液について、遠心分離により菌体を集め、培養液と等量から1/5量の100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) に懸濁した。これを、UH-50型超音波ホモゲナイザー (SMT社製) を用いて破碎した後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液60 $\mu$ lに終濃度30、40%または50%のジメチルホルムアミドを含むリン酸緩衝液 (pH 7.0) 60 $\mu$ lを加え、30 $^{\circ}$ C

でインキュベートした（ジメチルホルムアミド処理）。3時間目のジメチルホルムアミド処理液をサンプリングし、希釈して参考例4に示した方法で2-ペンタノンに対する還元活性を測定した。下記式より残存活性は算出し、この値をジメチルホルムアミドに対する安定性の指標とした。

$$\text{相対活性 (\%)} = [\text{3時間目の酵素活性 (溶剤添加)}] \div [\text{3時間目の酵素活性 (溶剤非添加)}] \times 100$$

ジメチルホルムアミド40%存在下で評価した野生型酵素および改変型カルボニル還元酵素の相対活性を表4に示す。

[0126] [表4]

変異部位	残存活性 (%)
野生型酵素	7.9
T257S	20.2
K259E	29.4
N102I-E226G-S267P	25.6
K270M	36.2
H71R-G300D	17.8

[0127] 表4に示した改変型カルボニル還元酵素は野生型酵素よりも有機溶剤に対する安定性が向上していた。

[0128] (実施例5) 改変型カルボニル還元酵素の評価2

実施例3で取得した改変型カルボニル還元酵素の各組換え菌および参考例3で作製した*E. coli* HB101 (pNKP) (対照)をそれぞれ参考例4と同様の方法で培養した。得られた各培養液について、遠心分離により菌体を集め、培養液と等量から1/5量の100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) に懸濁した。これを、UH-50型超音波ホモゲナイザー (SMT社製) を用いて破碎した後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。25μlの無細胞抽出液に等量の80%ジメチルホルムアミド溶液を加え、30℃で30分静置した。これに100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) 200μlを加え、混合した。この溶液15μlに終濃度0.625mMのNADPHと12.5mMの2,3-ブタンジオンを溶解した100mMリン酸緩衝液 (pH 6.5) を250μl加え、混合した。5秒振とう

し、NADPHの吸光（340nm）をBenchmark Plus microplate spectrophotometer（BIO-RAD社製）で15秒間測定し、その減少速度から2, 3-ブタンジオンに対する還元活性を求めた。下記式よりジメチルホルムアミド非添加時に対する添加時の酵素活性を算出し、この値をジメチルホルムアミドに対する安定性の指標とした。

$$\text{相対活性 (\%)} = \left[ \frac{\text{酵素活性 (ジメチルホルムアミド添加)}}{\text{酵素活性 (ジメチルホルムアミド非添加)}} \right] \times 100$$

野生型酵素および改変型カルボニル還元酵素の相対活性を表5に示す。

[0129] [表5]

変異部位	残存活性 (%)
野生型酵素	8
H71N-F195L	24
L177F-A220V	47
N45D-N175D-I183T	16
N102I-E226G-S267P	26
K22R	13
Y25F	11
T135A	13
Q155L	13
F195L	29
S212F	11
S212T	10
S212Y	12
E228V	28
T257S	20
K259E	29
N265K	28
S267P	38
K270M	38
R301C	41
S2I-V238I	36
H71R-G300D	12
E109G-K331F	9
I124L-S236N	38
I159F-K259E	15
L177F-A220V	47
K42R-Q155R-K279R	14
N45D-N175D-I183T	16
Q155L-S250P-Q298P	23
E56K-T138N-T190S-D254N	14

[0130] 表5に示した改変型カルボニル還元酵素は野生型酵素よりも有機溶剤に対する安定性が向上していた。

[0131] (実施例6) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製1

実施例2で取得したプラスミドpNKPM02を鋳型として、プライマー1: 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー3: 5' -GTTAATTTATTAGCGCGATTTTTTAATTACATG-3' (配列表の配列番号6)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257Sのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM02を鋳型として、プライマー4: 5' -CATGTAATTAAAAATCGCGCTAATGAAATTAAC-3' (配列表の配列番号7)、プライマー2: 5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACTTCA-3' (配列表の配列番号5)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちH71R、K259Eのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちH71R、K259Eのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM30を作製した。このpNKPM30を用いて、E. coli HB101コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素H71R-K259Eを生産する組換え生物E. coli HB101(pNKPM30)を得た。

[0132] (実施例7) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製2

実施例2で取得したプラスミドpNKPM02を鋳型として、プライマー1: 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー5: 5' -GATCAACC

TTTCACCGCTTAACTCATCATTATG-3' (配列表の配列番号8) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257Sのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM02を鋳型として、プライマー6:5'-CATAATGATGAGTTAAGCGGTGAAAGGTTGATC-3' (配列表の配列番号9)、プライマー2:5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACTTCA-3' (配列表の配列番号5) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257S、K259Eのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257S、K259Eのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM31を作製した。このpNKPM31を用いて、E. coli HB101コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素T257S-K259Eを生産する組換え生物E. coli HB101(pNKPM31)を得た。

[0133] (実施例8) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製3

実施例2で取得したプラスミドpNKPM02を鋳型として、プライマー1:5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー7:5'-CTCGTTATGGACACGATCTCCTTGAGGTA ACTC-3' (配列表の配列番号10) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、G300Dのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM02を鋳型として、プライマー8:5'-GAGTTACCTCAAGGAGATCGTGTC CAT AACGAG-3' (配列表の配列番号1

1)、プライマー2:5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちG300Dのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、G300Dのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKpm32を作製した。このpNKpm32を用いて、E. coli HB101コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素K259E-G300Dを生産する組換え生物E. coli HB101(pNKpm32)を得た。

[0134] (実施例9) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製4

実施例2で取得したプラスミドpNKpm04を鋳型として、プライマー1:5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー9:5' -GTTAATTTCAATTAGCGCGATTTTTTAATTACATG-3' (配列表の配列番号12)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちH71R、K270Mのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKpm02を鋳型として、プライマー10:5' -CATGTAATTAATAATCGCGCTAATGAAATTAAC-3' (配列表の配列番号13)、プライマー2:5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちH71R、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号

1に示すアミノ酸配列のうちH71R、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM33を作製した。このpNKPM33を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素H71R-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM33）を得た。

[0135]（実施例10）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製5

実施例2で取得したプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー1：5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3'（配列表の配列番号4）、プライマー11：5'-GGATACCTTTAGTACCAATAACAGCTGGGATTAAG-3'（配列表の配列番号14）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちN102Iのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー12：5'-CTTAATCCCAGCTGTTATTGGTACTAAAGGTATCC-3'（配列表の配列番号15）、プライマー2：5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちN102I、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちN102I、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM34を作製した。このpNKPM34を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素N102I-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM34）を得た。

## [0136] (実施例 1 1) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製 6

実施例 2 で取得したプラスミド pNK P m 0 4 を鋳型として、プライマー 1 : 5' - G G G A A T T C C A T A T G A G T G T T T T A G T T A C A G G - 3' (配列表の配列番号 4)、プライマー 1 3 : 5' - T T T A T C A A T T T C A C T G C C T G T T G G A G C A A A C A T A G C - 3' (配列表の配列番号 1 6) を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち E 2 2 6 G のアミノ酸置換を有する N 末端側のポリペプチドをコードする二本鎖 DNA を得た (N 末端側 DNA)。同様にプラスミド pNK P m 0 4 を鋳型として、プライマー 1 4 : 5' - G C T A T G T T T G C T C C A A C A G G C A G T G A A A T T G A T A A A - 3' (配列表の配列番号 1 7)、プライマー 2 : 5' - A T A C G C G T C G A C T T A C T A T T G T T C T T G A A C C T T C A - 3' (配列表の配列番号 5) を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち N E 2 2 6 G のアミノ酸置換を有する C 末端側のポリペプチドをコードする二本鎖 DNA を得た (C 末端側 DNA)。N 末端側 DNA と C 末端側 DNA を混合し、これを鋳型として、プライマー 1、プライマー 2 を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち E 2 2 6 G、K 2 7 0 M のアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖 DNA を得た。参考例 2 と同様の方法で p U C N 1 8 に導入し、pNK P m 3 5 を作製した。この pNK P m 3 5 を用いて、*E. coli* HB101 コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素 E 2 2 6 G - K 2 7 0 M を生産する組換え生物 *E. coli* HB101 (pNK P m 3 5) を得た。

## [0137] (実施例 1 2) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製 7

実施例 2 で取得したプラスミド pNK P m 0 4 を鋳型として、プライマー 1 : 5' - G G G A A T T C C A T A T G A G T G T T T T A G T T A C A G G - 3' (配列表の配列番号 4)、プライマー 1 5 : 5' - G A T C A A C C T T T T A C C G C T T A A C T C A T C A T T A T G - 3' (配列表の配列番号 1 8) を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のう

ちT257Sのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー16:5' -CATAATGATGAGTTAAGCGGTAAAAGGTTGATC-3' (配列表の配列番号19)、プライマー2:5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257S、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257S、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM36を作製した。このpNKPM36を用いて、*E. coli* HB101コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素T257S-K270Mを生産する組換え生物*E. coli* HB101(pNKPM36)を得た。

[0138] (実施例13) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製8

実施例2で取得したプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー1:5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー17:5' -GACAAGATCAACCTTTCCACCAGTTAACTCATC-3' (配列表の配列番号20)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259Eのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー18:5' -GATGAGTTAACTGGTGA AAGGTTGATCTTGTC-3' (配列表の配列番号21)、プライマー2:5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5)を用いてPCRを行い、配

列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM37を作製した。このpNKPM37を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素K259E-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM37）を得た。

[0139]（実施例14）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製9

実施例2で取得したプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー1：5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3'（配列表の配列番号4）、プライマー19：5'-TTTGCAATAGTGAACGGAGCATTGTGACAAG-3'（配列表の配列番号22）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS267Pのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー20：5'-CTTGTCAAATGCTCCGTTCACTATGCAAA-3'（配列表の配列番号23）、プライマー2：5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS267P、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS267P、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、

pNKPM38を作製した。このpNKPM38を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素S267P-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM38）を得た。

[0140]（実施例15）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製10

実施例2で取得したプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー1：5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3'（配列表の配列番号4）、プライマー21：5' -CTCGTTATGGACACGATCTCCTTGAGGTA ACTC-3'（配列表の配列番号24）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK270M、G300Dのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM04を鋳型として、プライマー22：5' -GAGTTACCTCAAGGAGATCGTGTC CAT AACGAG-3'（配列表の配列番号25）、プライマー2：5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちG300Dのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK270M、G300Dのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM39を作製した。このpNKPM39を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素K270M-G300Dを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM39）を得た。

[0141]（実施例16）多重変異改変型カルボニル還元酵素の評価1

実施例6～15で取得した多重変異改変型カルボニル還元酵素の各組換え菌

および参考例3で作製したE. coli HB101 (pNKP) (対照) をそれぞれ参考例4と同様の方法で培養した。実施例4と同様に多重変異改変型カルボニル還元酵素のジメチルホルムアミドに対する安定性を評価した。ジメチルホルムアミド40%存在下で評価した野生型酵素および改変型カルボニル還元酵素の相対活性を表6に示す。

[0142] [表6]

変異部位	残存活性 (%)
野生型酵素	8
K259E	25
K270M	31
H71R-K259E	30
T257S-K259E	38
K259E-G300D	36
H71R-K270M	29
N102I-K270M	26
E226G-K270M	31
T257S-K270M	44
K259E-K270M	64
S267P-K270M	33
K270M-G300D	44

[0143] 表6に示した改変型カルボニル還元酵素は野生型酵素よりも有機溶剤に対する安定性が向上していた。

[0144] (実施例17) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製11

実施例7で取得したプラスミドpNKPm37を鋳型として、プライマー1 : 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー23 : 5' -CCAGTAGCACCTGTA ACTAAAACAATCAT-3' (配列表の配列番号26) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS21のアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPm37を鋳型として、プライマー24 : 5' -ATGATTGTTTTAGTTACAGGTGCTACTGG-3' (配列表の配列番号27)、プライマー2 : 5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA

−3′（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS21、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS21、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM40を作製した。このpNKPM40を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素S21−K259E−K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM40）を得た。

[0145]（実施例18）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製12

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1：5′−GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG−3′（配列表の配列番号4）、プライマー25：5′−GGCAGCAATTGAAGAAGTCAGAACAAATTTCTTCAC−3′（配列表の配列番号28）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちI124Lのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー26：5′−GTGAAGAAATTTGTTCTGACTTCTTCAATTGCTGCC−3′（配列表の配列番号29）、プライマー2：5′−ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA−3′（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちI124L、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちI124L、K259E、

K 2 7 0 Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM41を作製した。このpNKPM41を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素L124L-K259E-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM41）を得た。

[0146]（実施例19）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製13

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1：5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3'（配列表の配列番号4）、プライマー27：5' -CCTTTATTCTCTTCAAAGAAGTTCCAAGCAGC-3'（配列表の配列番号30）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちL177Fのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー28：5' -GCTGCTTGGAAC TTCTTTGAAGAGAATAAAGG-3'（配列表の配列番号31）、プライマー2：5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTG AACCTTCA-3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちL177F、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちL177F、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM42を作製した。このpNKPM42を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素L177F-K259E-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pN

K P m 4 2) を得た。

[0147] (実施例 20) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製 14

実施例 7 で取得したプラスミド p N K P m 3 7 を鋳型として、プライマー 1 : 5' - G G G A A T T C C A T A T G A G T G T T T T A G T T A C A G G - 3' (配列表の配列番号 4)、プライマー 29 : 5' - G G A C C A A A G A C C A G A A C T G G G T T G A T C G - 3' (配列表の配列番号 32) を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち F 1 9 5 L のアミノ酸置換を有する N 末端側のポリペプチドをコードする二本鎖 DNA を得た (N 末端側 DNA)。同様にプラスミド p N K P m 3 7 を鋳型として、プライマー 30 : 5' - C G A T C A A C C C A G T T C T G G T C T T T G G T C C - 3' (配列表の配列番号 33)、プライマー 2 : 5' - A T A C G C G T C G A C T T A C T A T T G T T C T T G A A C C T T C A - 3' (配列表の配列番号 5) を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち F 1 9 5 L、K 2 5 9 E、K 2 7 0 M のアミノ酸置換を有する C 末端側のポリペプチドをコードする二本鎖 DNA を得た (C 末端側 DNA)。N 末端側 DNA と C 末端側 DNA を混合し、これを鋳型として、プライマー 1、プライマー 2 を用いて PCR を行い、配列番号 1 に示すアミノ酸配列のうち F 1 9 5 L、K 2 5 9 E、K 2 7 0 M のアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖 DNA を得た。参考例 2 と同様の方法で p U C N 1 8 に導入し、p N K P m 4 3 を作製した。この p N K P m 4 3 を用いて、E. coli HB101 コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素 F 1 9 5 L - K 2 5 9 E - K 2 7 0 M を生産する組換え生物 E. coli HB101 (p N K P m 4 3) を得た。

[0148] (実施例 21) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製 15

実施例 7 で取得したプラスミド p N K P m 3 7 を鋳型として、プライマー 1 : 5' - G G G A A T T C C A T A T G A G T G T T T T A G T T A C A G G - 3' (配列表の配列番号 4)、プライマー 31 : 5' - C T G T T G G

AGCAAACATCACTTCCTTGATGATTTTC-3' (配列表の配列番号34) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちA220Vのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー32:5'-GAAATCATCAAGGAAGTGATGTTTGCTCCAACAG-3' (配列表の配列番号35)、プライマー2:5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちA220V、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちA220V、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM44を作製した。このpNKPM44を用いて、E. coli HB101コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素A220V-K259E-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101(pNKPM44)を得た。

[0149] (実施例22) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製16

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1:5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー33:5'-CGTACATCAACATAGTTACCAAAAACAGATTTATC-3' (配列表の配列番号36) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS236Nのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー34:5'-GATAAATCTGTTTT

TGGTAACTATGTTGATGTACG-3' (配列表の配列番号37)、プライマー2:5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS236N、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちS236N、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM45を作製した。このpNKPM45を用いて、*E. coli* HB101コンピテントセル(タカラバイオ社製)を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素S236N-K259E-K270Mを生産する組換え生物*E. coli* HB101(pNKPM45)を得た。

[0150] (実施例23) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製17

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1:5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー35:5'-GCTACATCACGTACATCAATATAACTACCAAAAAC-3' (配列表の配列番号38)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちV238Iのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た(N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー36:5'-GTTTTTGGTAGTTATATTGATGTACGTGATGTAGC-3' (配列表の配列番号39)、プライマー2:5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5)を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちV238I、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二

本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちV238I、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM46を作製した。このpNKPM46を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素V238I-K259E-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM46）を得た。

[0151]（実施例24）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製18

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1：5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3'（配列表の配列番号4）、プライマー37：5'-GATCAACCTTTTACCGCTTAACTCATCATTATG-3'（配列表の配列番号40）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257Sのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー38：5'-CATAATGATGAGTTAAGCGGTAAGGTTGATC-3'（配列表の配列番号41）、プライマー2：5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257S、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちT257S、K259E、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM47を作製した。こ

のpNKPM47を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素T257S-K259E-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM47）を得た。

[0152]（実施例25）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製19

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1：5'-GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3'（配列表の配列番号4）、プライマー39：5'-GCATAGTGAATGAAGCTTTTGACAAGATCAACCTTTCACCC-3'（配列表の配列番号42）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、N265Kのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー40：5'-GGTGAAAGGTTGATCTTGTCAAAGCTTTCATTCACTATGC-3'（配列表の配列番号43）、プライマー2：5'-ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、N265K、K270Mのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、N265K、K270Mのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM48を作製した。このpNKPM48を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素K259E-N265K-K270Mを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM48）を得た。

[0153]（実施例26）多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製20

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1 : 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー41 : 5' -CTCGTTATGGACACGATCTCCTTGAGGTA ACTC-3' (配列表の配列番号44) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270M、G300Dのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た (N末端側DNA)。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー42 : 5' -GAGTTACCTCAAGGAGATCGTGTCCATAACGAG-3' (配列表の配列番号45)、プライマー2 : 5' -ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA-3' (配列表の配列番号5) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270M、G300Dのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た (C末端側DNA)。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270M、G300Dのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM49を作製した。このpNKPM49を用いて、E. coli HB101コンピテントセル (タカラバイオ社製) を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素K259E-K270M-G300Dを生産する組換え生物E. coli HB101 (pNKPM49) を得た。

[0154] (実施例27) 多重変異改変型カルボニル還元酵素の作製21

実施例7で取得したプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー1 : 5' -GGGAATTCCATATGAGTGTTTTAGTTACAGG-3' (配列表の配列番号4)、プライマー43 : 5' -CTTCTCGTTATGGACGCAACCTCCTTGAGGTA ACTCG-3' (配列表の配列番号46) を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸

配列のうちK259E、K270M、R301Cのアミノ酸置換を有するN末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（N末端側DNA）。同様にプラスミドpNKPM37を鋳型として、プライマー44：5' - CGAGTTACCTCAAGGAGGTTGCGTCCATAACGAG AAG - 3'（配列表の配列番号47）、プライマー2：5' - ATACGCGTCGACTTACTATTGTTCTTGAACCTTCA - 3'（配列表の配列番号5）を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270M、R301Cのアミノ酸置換を有するC末端側のポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た（C末端側DNA）。N末端側DNAとC末端側DNAを混合し、これを鋳型として、プライマー1、プライマー2を用いてPCRを行い、配列番号1に示すアミノ酸配列のうちK259E、K270M、R301Cのアミノ酸置換を有するポリペプチドをコードする二本鎖DNAを得た。参考例2と同様の方法でpUCN18に導入し、pNKPM50を作製した。このpNKPM50を用いて、E. coli HB101コンピテントセル（タカラバイオ社製）を形質転換し、改変型カルボニル還元酵素K259E-K270M-R301Cを生産する組換え生物E. coli HB101（pNKPM50）を得た。

[0155]（実施例28）多重変異改変型カルボニル還元酵素の評価2

実施例17～27で取得した多重変異改変型カルボニル還元酵素の各組換え菌および参考例3で作製したE. coli HB101（pNKPM）（対照）をそれぞれ参考例4と同様の方法で培養した。実施例4と同様に多重変異改変型カルボニル還元酵素のジメチルホルムアミドに対する安定性を評価した。ジメチルホルムアミド50%存在下で評価した野生型酵素および改変型カルボニル還元酵素の相対活性を表7に示す。

[0156]

[表7]

変異部位	残存活性 (%)
野生型酵素	0
K270M	1
K259E-K270M	5
S2I-K259E-K270M	2
I124L-K259E-K270M	25
L177F-K259E-K270M	3
F195L-K259E-K270M	21
A220V-K259E-K270M	16
S236N-K259E-K270M	24
V238I-K259E-K270M	15
T257S-K259E-K270M	33
N265K-K259E-K270M	15
G300D-K259E-K270M	20
R301C-K259E-K270M	35

[0157] 表7に示した改変型カルボニル還元酵素は野生型酵素よりも有機溶剤に対する安定性が向上していた。

[0158] (実施例29) 変異酵素ライブラリーの作製2

実施例15で取得したK259E-K270M変異酵素の変異型RKP遺伝子を含むプラスミドpNKPm37をテンプレートに実施例1と同様の方法で変異酵素ライブラリーを作成し、これを変異酵素ライブラリー2とした。

[0159] (実施例30) 改変型カルボニル還元酵素の選抜3

変異酵素ライブラリー2より有機溶剤の1つであるジメチルホルムアミドによる反応阻害に対する抵抗性が向上した改変型カルボニル還元酵素を選抜した。実施例29で作製した変異酵素ライブラリー2の各組換え菌および参考例3で作製した*E. coli* HB101 (pNKP) (対照)を100μg/mLのアンピシリンを含むLBプレート培地上に植菌した。

[0160] 得られたコロニーをナイロン膜 (Biodyne A、0.45μm) に転写した後、そのナイロン膜を40%のジメチルホルムアミドを含む50mMの3-(N-morpholino) propanesulfonic acid (MOPS) バッファー中に30~60分浸漬した。その後、このナイロン膜を1mMのNADP<sup>+</sup>、200μMのnitroblue tetrazolium、10μMの1-methoxy-5-methylphen

azinium methyl sulfateおよび5% (v/v) の2-プロパノールを含む50 mMのMOPSバッファー中に室温で30分浸漬した。その後、ナイロン膜を蒸留水で洗浄し、染色されたコロニーを有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌の候補として選抜した。これらの候補株を200 μg/mlのアンピシリンを含む2×YT培地（トリプトン1.6%、イーストエキス1.0%、塩化ナトリウム0.5%、pH7.0）5 mlに接種し、20時間培養した。得られた培養液を菌体破碎処理し、遠心分離後、沈殿を除去し、無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液を96穴プレート（AGCテクノグラス社製）に200 μl分注し、NADPH0.625 mMと10 mMの2,3-ブタンジオンを含む0.1 Mリン酸緩衝液（pH6.5）50 μlを加え混合した。経時的にBenchmark Plus microplate spectrophotometer（BIO-RAD社製）でNADPHの蛍光を観察した。2,3-ブタンジオンの還元によってNADPHが消費され、蛍光がなくなったものを、有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性がさらに向上した改変型カルボニル還元酵素の組換え菌として選抜した。選抜した組換え菌の培養液からプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit（アプライドバイオシステムズジャパン社製）およびApplied Biosystems 3130×1ジェネティックアナライザ（アプライドバイオシステムズジャパン社製）を用いて変異型RKP遺伝子の塩基配列を決定し、変異部位を特定した。得られた有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した改変型カルボニル還元酵素を表8に示す。

[0161] [表8]

プラスミド名称	変異部位
pNKPm51	K22R-F87I-K259E-K270M
pNKPm52	D90G-K259E-K270M
pNKPm53	K39R-T51A-K259E-K270M

表8に示す3種類の有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した酵素

を取得した。

[0162] (実施例31) 改変型カルボニル還元酵素の評価3

実施例30で取得した改変型カルボニル還元酵素の各組換え菌および参考例3で作製した *E. coli* HB101 (pNKP) (対照) をそれぞれ参考例4と同様の方法で培養した。得られた各培養液について、遠心分離により菌体を集め、培養液の1/5量の100mMリン酸緩衝液 (pH6.5) に懸濁した。これを、UH-50型超音波ホモゲナイザー (SMT社製) を用いて破碎した後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。無細胞抽出液100 $\mu$ lに1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 400 $\mu$ l、水または60%DMF溶液500 $\mu$ l、2-ヘキサノン1%、NADPH5%、グルコース3.4%を混合し30 $^{\circ}$ Cで2時間攪拌し、反応した。反応後、反応液を酢酸エチルで抽出した。抽出液を下記の [ガスクロマトグラフィーによる分析条件] に記載の条件で分析することにより、2-ヘキサノールの生成を確認した。2-ヘキサノールと2-ヘキサノンのピーク面積から変換率を算出した。

[0163] [ガスクロマトグラフィーによる分析条件]

カラム: InertCap1 キャピラリーカラム (30m、内径0.25mm、ジーエルサイエンス社製)

検出器: 水素炎イオン化検出器

注入部温度: 250 $^{\circ}$ C

カラム温度: 50 $^{\circ}$ C

検出器温度: 250 $^{\circ}$ C

キャリアーガス: ヘリウム、流量150kPa

[0164] この変換率から、各組換え菌のジメチルホルムアミド非存在条件に対する、ジメチルホルムアミド60%存在下での相対活性を算出した。相対活性は下記式より算出し、この値をジメチルホルムアミドによる反応阻害の指標とした。結果を表9に示す。

相対活性 (%) = [ジメチルホルムアミド存在下での変換率]  $\div$  [ジメチル

ホルムアミド非存在下での変換率] × 100

得られた有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した改変型カルボニル還元酵素を表9に示す。

[0165] [表9]

変異部位	残存活性 (%)
野生型酵素	24
K22R-F87I-K259E-K270M	35
D90G-K259E-K270M	31
K39R-T51A-K259E-K270M	31

表9に示す3種類の有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上した酵素を取得した。表に示した改変型カルボニル還元酵素は野生型酵素よりも有機溶剤の1つであるジメチルホルムアミドによる反応阻害に対する抵抗性が向上していた。

[0166] (実施例32) 3-[ (5R) - (4-フルオロフェニル) - 5-ヒドロキシペンタノイル] - (4S) - フェニル-1, 3-オキサゾリジン-2-オンの製造

参考例4で取得したヴァンデルワルトザイマ・ポリスポラ (*Vanderwaltozyma polyspora*) NBRC0996株由来のカルボニル還元酵素RKP (野生型) を発現する組換え大腸菌の培養液、および実施例24で取得した改変型カルボニル還元酵素T257S-K259E-K270Mを生産する組換え大腸菌を参考例4と同様の方法を用いて培養した培養液700 $\mu$ lに、グルコース脱水素酵素 (商品名: GLUCDH "Amano" II、天野エンザイム社製) 12.5U、グルコース80mg、NADP<sup>+</sup> 0.6mg、ジメチルホルムアミドまたは0.1Mリン酸緩衝液 (pH7) 300 $\mu$ l、(S)-1-(4-フルオロフェニル)-5-(2-オキソ-4-フェニル-オキサゾリジン-3-イル)-ペンタン-1, 5-ジオン10mgを加えて、30 $^{\circ}$ Cで20時間攪拌した。反応液をジメチルスルホキシドで希釈し、下記の条件で高速液体クロマトグラフィー分析し、3-[ (5R) - (4-フルオロフェニル) - 5-ヒドロキシペンタノイル

] - (4S) - フェニル - 1, 3 - オキサゾリジン - 2 - オンへの変換率、その光学純度を測定した。その結果を表10に示す。

[0167] [表10]

酵素	DMF濃度(%)	変換率(%)	S体の光学純度(%e.e)
野生型	0	54.4	89.21
野生型	30	16.6	87.89
T257S-K259E-K270M	0	47.5	80.15
T257S-K259E-K270M	30	99.0	73.91

[0168] [3 - [ (5R) - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシペンタノイル] - (4S) - フェニル - 1, 3 - オキサゾリジン - 2 - オンへの変換率の算出方法と分析条件]

カラム: COSMOSIL 5C8-MS (250mm、内径4.6μm、ナカライテスク社製)

カラム温度: 40℃

検出波長: 254nm

移動相: 水/アセトニトリル = 1/1

保持時間: [3 - [ (5) - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシペンタノイル] - (4) - フェニル - 1, 3 - オキサゾリジン - 2 - オン 約8.5分、1 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - オキソ - 4 - フェニル - オキサゾリジン - 3 - イル) - ペンタン - 1, 5 - ジオン 約12.9分

変換率 = [3 - [ (5) - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシペンタノイル] - (4) - フェニル - 1, 3 - オキサゾリジン - 2 - オンの生成量 / ([3 - [ (5) - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシペンタノイル] - (4) - フェニル - 1, 3 - オキサゾリジン - 2 - オンの生成量 + 1 - (4 - フルオロフェニル) - 5 - (2 - オキソ - 4 - フェニル - オキサゾリジン - 3 - イル) - ペンタン - 1, 5 - ジオンの残存量) × 100

[3 - [ (5R) - (4 - フルオロフェニル) - 5 - ヒドロキシペンタノイル] - (4S) - フェニル - 1, 3 - オキサゾリジン - 2 - オンの光学純

度の算出方法と分析条件]

カラム：CHIRALCEL OD-H（250mm、内径4.6 $\mu$ m、ダイセル化学工業社製）

カラム温度：30 $^{\circ}$ C

検出波長：254nm

移動相：ヘキサン/エタノール=8/2

保持時間：3-[(5R)-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシペンタノイル]-（4S）-フェニル-1,3-オキサゾリジン-2-オン

約18.1分、3-[(5S)-(4-フルオロフェニル)-5-ヒドロキシペンタノイル]-（4S）-フェニル-1,3-オキサゾリジン-2-オン 約21.7分

R体の光学純度(%e.e.) = { (R体のピーク面積) - (S体のピーク面積) }  $\div$  { (R体のピーク面積) + (S体のピーク面積) }  $\times$  100

## 請求の範囲

- [請求項1] 以下の (a) ~ (c) ;
- (a) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列と 78% 以上の配列同一性を有し、
  - (b) 2-ペンタノン還元して2-ペンタノールを生成し、かつ、
  - (c) 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤存在下でカルボニル化合物に対する反応性が高い、および/または熱安定性が高い、の性質を示すポリペプチド。
- [請求項2] 前記有機溶剤がジメチルホルムアミドである、請求項 1 に記載のポリペプチド。
- [請求項3] 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において次の群 ;
- 2 番目、22 番目、25 番目、39 番目、42 番目、45 番目、51 番目、56 番目、71 番目、87 番目、90 番目、102 番目、109 番目、124 番目、135 番目、138 番目、155 番目、159 番目、175 番目、177 番目、183 番目、190 番目、195 番目、212 番目、220 番目、226 番目、228 番目、236 番目、238 番目、250 番目、254 番目、257 番目、259 番目、265 番目、267 番目、270 番目、279 番目、298 番目、300 番目、301 番目、および331 番目から選択される1つ以上のアミノ酸に、アミノ酸置換が導入されている、請求項 1 または 2 に記載のポリペプチド。
- [請求項4] アミノ酸置換が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において次の群 ;
- 2 番目がイソロイシン、22 番目がアルギニン、25 番目がフェニルアラニン、39 番目がアルギニン、42 番目がアルギニン、45 番目がアスパラギン酸、51 番目がアラニン、56 番目がリジン、71 番目がアスパラギンもしくはアルギニン、87 番目がイソロイシン、9

0番目がグリシン、102番目がイソロイシン、109番目がグリシン、124番目がロイシン、135番目がアラニン、138番目がアスパラギン、155番目がロイシンもしくはアルギニン、159番目がフェニルアラニン、175番目がアスパラギン酸、177番目がフェニルアラニン、183番目がスレオニン、190番目がセリン、195番目がロイシン、212番目がフェニルアラニン、スレオニンもしくはチロシン、220番目がバリン、226番目がグリシン、228番目がバリン、236番目がアスパラギン、238番目がイソロイシン、250番目がプロリン、254番目がアスパラギン、257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、267番目がプロリン、270番目がメチオニン、279番目がアルギニン、298番目がプロリン、300番目がアスパラギン酸、301番目がシステイン、および、331番目がフェニルアラニンに置換されるアミノ酸置換、

から選択される1つ以上のアミノ酸置換である、請求項3に記載のポリペプチド。

[請求項5]

アミノ酸置換が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において次の群；

2番目がイソロイシン、45番目がアスパラギン酸、71番目がアスパラギンもしくはアルギニン、102番目がイソロイシン、124番目がロイシン、175番目がアスパラギン酸、177番目がフェニルアラニン、183番目がスレオニン、195番目がロイシン、220番目がバリン、226番目がグリシン、236番目がアスパラギン、238番目がイソロイシン、257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、267番目がプロリン、270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、および、301番目がシステインに置換されるアミノ酸置換、

から選択される1つ以上のアミノ酸置換であり、

配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤に対する安定性が向上している、請求項 4 に記載のポリペプチド。

[請求項 6]

アミノ酸置換が、配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において下記の (1) ~ (35) ;

- (1) 71 番目がアスパラギン、195 番目がロイシン、
- (2) 71 番目がアルギニン、259 番目がグルタミン酸、
- (3) 71 番目がアルギニン、270 番目がメチオニン、
- (4) 71 番目がアルギニン、300 番目がアスパラギン酸、
- (5) 102 番目がイソロイシン、270 番目がメチオニン、
- (6) 177 番目がフェニルアラニン、220 番目がバリン、
- (7) 226 番目がグリシン、270 番目がメチオニン、
- (8) 257 番目がセリン、259 番目がグルタミン酸、
- (9) 257 番目がセリン、270 番目がメチオニン、
- (10) 259 番目がグルタミン酸、270 番目がメチオニン、
- (11) 259 番目がグルタミン酸、300 番目がアスパラギン酸、
- (12) 267 番目がプロリン、270 番目がメチオニン、
- (13) 270 番目がメチオニン、300 番目がアスパラギン酸、
- (14) 2 番目がイソロイシン、259 番目がグルタミン酸、270 番目がメチオニン、
- (15) 45 番目がアスパラギン酸、175 番目がアスパラギン酸、183 番目がスレオニン、
- (16) 102 番目がイソロイシン、226 番目がグリシン、267 番目がプロリン、
- (17) 124 番目がロイシン、259 番目がグルタミン酸、270 番目がメチオニン、
- (18) 177 番目がフェニルアラニン、259 番目がグルタミン酸、270 番目がメチオニン、

- (19) 220番目がバリン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (20) 236番目がアスパラギン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (21) 238番目がイソロイシン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (22) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、
- (23) 257番目がセリン、259番目がグルタミン酸、300番目がアスパラギン酸、
- (24) 259番目がグルタミン酸、265番目がリジン、270番目がメチオニン、
- (25) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、300番目がアスパラギン酸、
- (26) 259番目がグルタミン酸、270番目がメチオニン、301番目がシステイン、
- (27) 2番目がイソロイシン、238番目がイソロイシン、
- (28) 71番目がアスパラギン、195番目がロイシン、
- (29) 109番目がグリシン、331番目がフェニルアラニン、
- (30) 124番目がロイシン、236番目がアスパラギン、
- (31) 159番目がフェニルアラニン、259番目がグルタミン酸、
- (32) 42番目がアルギニン、155番目がアルギニン、279番目がアルギニン、
- (33) 45番目がアスパラギン酸、175番目がアスパラギン酸、183番目がスレオニン、
- (34) 155番目がロイシン、250番目がプロリン、298番目がプロリン、および

(35) 56番目がリジン、138番目がアスパラギン、190番目がセリン、254番目がアスパラギンに置換されるアミノ酸置換、から選択されるアミノ酸置換が導入されている、請求項5に記載のポリペプチド。

[請求項7]

アミノ酸置換が、次の群；

22番目がアルギニン、39番目がアルギニン、51番目がアラニン、87番目がイソロイシン、90番目がグリシン、259番目がグルタミン酸、および、270番目がメチオニンに置換されるアミノ酸置換、

から選択される1つ以上のアミノ酸置換であり、

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列からなるカルボニル還元酵素と比較して、有機溶剤による反応阻害に対する抵抗性が向上している、請求項4に記載のポリペプチド。

[請求項8]

アミノ酸置換が、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列において下記の(1)～(7)；

(1) 22番目がアルギニン、

(2) 22番目がアルギニン、87番目がイソロイシン、

(3) 39番目がアルギニン、

(4) 39番目がアルギニン、51番目がアラニン、

(5) 51番目がアラニン、

(6) 87番目がイソロイシン、および

(7) 90番目がグリシンに置換されるアミノ酸置換、

から選択される1つ以上のアミノ酸置換である、請求項7に記載のポリペプチド。

[請求項9]

請求項1～8のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

[請求項10]

請求項9に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

[請求項11]

還元型補酵素再生能を有するポリペプチドをコードするポリヌクレオ

チドをさらに含む、請求項 10 に記載のベクター。

[請求項12] 還元型補酵素再生能を有するポリペプチドがグルコース脱水素酵素である、請求項 11 に記載のベクター。

[請求項13] 請求項 10～12 のいずれか 1 項に記載のベクターにより宿主細胞を形質転換して得られる形質転換体。

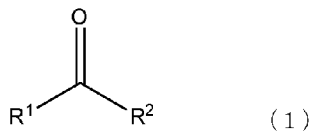
[請求項14] 前記宿主細胞が大腸菌である請求項 13 に記載の形質転換体。

[請求項15] 請求項 1～8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド、または、請求項 13 または請求項 14 に記載の形質転換体および／またはその処理物を、カルボニル化合物に作用させることを特徴とする、アルコール化合物の製造方法。

[請求項16] 前記カルボニル化合物が非対称ケトンであり、前記アルコール化合物が光学活性アルコールである、請求項 15 に記載の製造方法。

[請求項17] 前記カルボニル化合物が、下記式 (1) :

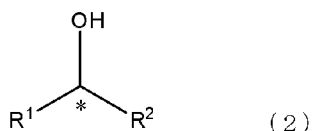
[化1]



(式中、R<sup>1</sup>およびR<sup>2</sup>は水素原子、ハロゲン原子、置換されていても良いアルキル基、置換されていても良いアラルキル基、置換されていても良いアリール基、置換されていても良いアルコキシ基、アミノ基、またはニトロ基であるか、もしくは、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>が互いに結合し環を形成しても良い。但し、R<sup>1</sup>とR<sup>2</sup>は構造が異なる) で表される非対称ケトンであり、

前記アルコール化合物が下記式 (2) :

[化2]



(式中、R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>は前記と同じ、\*は不斉炭素を表す) で表される

光学活性アルコールである、請求項 1 5 または 1 6 に記載の製造方法

。

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2014/058248

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P7/02(2006.01)i

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)  
C12N15/09, C12N1/21, C12N9/02, C12P7/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/CaPlus/WPIDS (STN)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/142865 A2 (GEVO, INC.), 17 November 2011 (17.11.2011), entire text & JP 2013-519376 A & US 2011/0201072 A1 & EP 2534240 A & CN 102869763 A & KR 10-2012-0129953 A	1-17
A	WO 2012/129555 A2 (BUTAMAX(TM) ADVANCED BIOFUELS LLC), 27 September 2012 (27.09.2012), entire text & US 2012/0258873 A1	1-17

Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 17 April, 2014 (17.04.14)	Date of mailing of the international search report 28 April, 2014 (28.04.14)
--	---

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/058248

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/090753 A2 (BUTAMAX(TM) ADVANCED BIOFUELS LLC), 28 July 2011 (28.07.2011), entire text & JP 2013-515506 A                      & US 2011/0269199 A1 & EP 2519628 A                              & CN 102762722 A & KR 10-2012-0115349 A	1-17
A	WO 2005/075651 A1 (API Corp.), 18 August 2005 (18.08.2005), entire text & JP 2005-245439 A                      & US 2008/0233621 A1 & EP 1712630 A1                              & KR 10-2007-0013269 A & CN 1950508 A	1-17
A	Juan Lucas Argueso et al., Genome structure of a Saccharomyces cerevisiae strain widely used in bioethanol production, Genome Research, 2009, Vol.19, PP.2258-2270	1-17
P,A	Marta Goretti et al., Production of Flavours and Fragrances via Bioreduction of (4R)-(-)-Carvone and (1R)-(-)-Myrtenal by Non-Conventional Yeast Whole-Cells, molecules, 2013.05.16, VOL.18, PP.5736-5748	1-17

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N9/02(2006.01)i, C12P7/02(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C12N15/09, C12N1/21, C12N9/02, C12P7/02		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2014年 日本国実用新案登録公報 1996-2014年 日本国登録実用新案公報 1994-2014年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) UniProt/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/CAplus/WPIDS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2011/142865 A2 (GEVO, INC.) 2011. 11. 17, 全文 & JP 2013-519376 A & US 2011/0201072 A1 & EP 2534240 A & CN 102869763 A & KR 10-2012-0129953 A	1-17
A	WO 2012/129555 A2 (BUTAMAX(TM) ADVANCED BIOFUELS LLC) 2012. 09. 27, 全文 & US 2012/0258873 A1	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <span style="margin-left: 200px;"><input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</span>		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 17. 04. 2014	国際調査報告の発送日 28. 04. 2014	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 大久保 智之 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4 B    3 4 4 6

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2011/090753 A2 (BUTAMAX(TM) ADVANCED BIOFUELS LLC) 2011.07.28, 全文 & JP 2013-515506 A & US 2011/0269199 A1 & EP 2519628 A & CN 102762722 A & KR 10-2012-0115349 A	1-17
A	WO 2005/075651 A1 (株式会社エーピーアイコーポレーション) 2005.08.18, 全文 & JP 2005-245439 A & US 2008/0233621 A1 & EP 1712630 A1 & KR 10-2007-0013269 A & CN 1950508 A	1-17
A	Juan Lucas Argueso et al., Genome structure of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain widely used in bioethanol production, <i>Genome Research</i> , 2009, Vol.19, PP.2258-2270	1-17
P, A	Marta Goretti et al., Production of Flavours and Fragrances via Bioreduction of (4R)-(-)-Carvone and (1R)-(-)-Myrtenal by Non-Conventional Yeast Whole-Cells, <i>molecules</i> , 2013.05.16, Vol.18, PP.5736-5748	1-17