

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6330028号
(P6330028)

(45) 発行日 平成30年5月23日(2018.5.23)

(24) 登録日 平成30年4月27日(2018.4.27)

| | |
|--------------|--------------------------------|
| (51) Int.Cl. | F 1 |
| C 12 N 1/21 | (2006.01) C 12 N 1/21 |
| C 12 N 15/09 | (2006.01) C 12 N 15/00 Z N A A |
| C 12 P 7/02 | (2006.01) C 12 P 7/02 |
| C 12 P 7/22 | (2006.01) C 12 P 7/22 |
| C 12 P 7/62 | (2006.01) C 12 P 7/62 |

請求項の数 22 (全 62 頁) 最終頁に続く

| | |
|---------------|-------------------------------|
| (21) 出願番号 | 特願2016-508291 (P2016-508291) |
| (86) (22) 出願日 | 平成26年4月17日 (2014.4.17) |
| (65) 公表番号 | 特表2016-515399 (P2016-515399A) |
| (43) 公表日 | 平成28年5月30日 (2016.5.30) |
| (86) 國際出願番号 | PCT/IN2014/000247 |
| (87) 國際公開番号 | W02014/170917 |
| (87) 國際公開日 | 平成26年10月23日 (2014.10.23) |
| 審査請求日 | 平成28年9月28日 (2016.9.28) |
| (31) 優先権主張番号 | 1146/DEL/2013 |
| (32) 優先日 | 平成25年4月17日 (2013.4.17) |
| (33) 優先権主張国 | インド (IN) |
| 微生物の受託番号 | MTCC MTCC 5806 |
| 微生物の受託番号 | MTCC MTCC 5807 |
| 微生物の受託番号 | MTCC MTCC 5808 |
| 微生物の受託番号 | MTCC MTCC 5809 |

| | |
|-----------|---|
| (73) 特許権者 | 508176500 カウンシル オブ サイエンティフィック アンド インダストリアル リサーチ インド 110001 ニューデリー ラ フィ マーグ アヌサンダン バワン (|
| (74) 代理人 | 100086771 弁理士 西島 孝喜 |
| (74) 代理人 | 100088694 弁理士 弟子丸 健 |
| (74) 代理人 | 100094569 弁理士 田中 伸一郎 |
| (74) 代理人 | 100084663 弁理士 箱田 篤 |

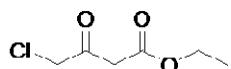
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】ケトンのエナンチオ選択性還元のためのデザイナー細胞及びエナンチオ濃縮アルコールの効率的製造におけるその使用

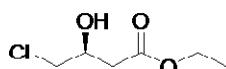
(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性を有する、前記デザイナー細胞。



式 1



式 2

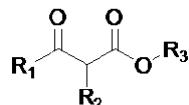
【請求項 2】

配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり15

倍から26倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。

【請求項3】

配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、下記式3の化合物の還元についてCRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から275倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。



10

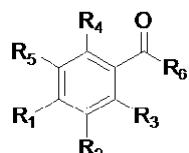
式3

(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、及び $m = 1 - 8$ である。)

【請求項4】

配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、下記式4の化合物の還元についてCRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から180倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。

20



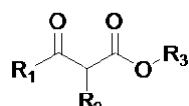
式4

(式中、 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{R}_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $\text{R}_6 = \text{アルキル基}$ であり、及び $n = 1$ から5である。)

30

【請求項5】

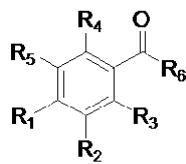
配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元について単位細胞質量当たり約3倍から15倍高い活性を有する、請求項1に記載のデザイナー細胞。



40

式3

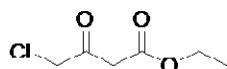
(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、及び $m = 1 - 8$ である。)



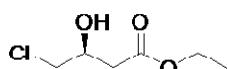
(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基であり、及びn = 1から5である。)

【請求項 6】

配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性、及びグルコースからグルコネットへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり200倍から250倍強化された活性を有する、前記デザイナー細胞。



式 1



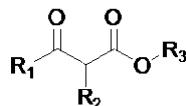
式 2

【請求項 7】

配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり11倍から24倍強化された活性、及びグルコースからグルコネットへの酸化について単位細胞質量当たり9倍から31倍強化された活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。

【請求項 8】

配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式3の化合物の還元についてCRSポリペプチドの単位質量当たり約55倍から270倍高い活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基であり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、及びm = 1 - 8である。)

10

20

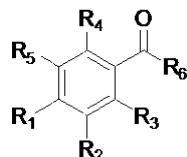
30

40

50

【請求項 9】

配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式4の化合物の還元についてCRSポリペプチドの単位質量当たり約40倍から156倍高い活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。

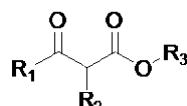


式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基であり、及び $n = 1$ から5である。)

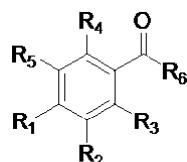
【請求項 10】

配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元について単位細胞質量当たり約3倍から24倍高い活性を有する、請求項6に記載のデザイナー細胞。



式 3

(式中、 $R_1 = CH_3$ 、 CH_2X 、 $(CH_3)_2CH$ 、 CF_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_2 = H$ 、 X 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 R_3 = アルキル基であり、 $X = Cl$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、及び $m = 1 - 8$ である。)



式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基であり、及び $n = 1$ から5である。)

【請求項 11】

組換え大腸菌(*Escherichia coli*)BL21(DE3)、又は組換え大腸菌C41(DE3)、又は組換え大腸菌C43(DE3)から調製される、請求項1又は6に記載のデザイナー細胞。

【請求項 12】

カルボニルレダクターゼ活性を示す、配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列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含む組換え発現ベクター。

【請求項 13】

カルボニルレダクターゼ活性を示す配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及びGDH活性を示す配列番号:9又は11のアミノ酸配列を有するポリペプ

10

20

30

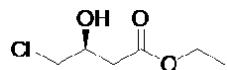
40

50

チドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

【請求項 1 4】

約100% 鏡像体過剰の下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの製造のための請求項1又は6に記載のデザイナー細胞の使用。

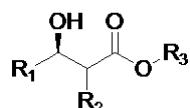


式 2

10

【請求項 1 5】

下記式5の化合物の製造のための請求項1又は6に記載のデザイナー細胞の使用。



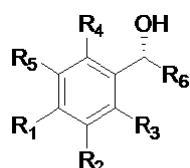
式 5

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基であり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、及びm = 1 - 8である。)

20

【請求項 1 6】

下記式6の化合物の製造のための請求項1又は6に記載のデザイナー細胞の使用。



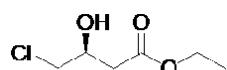
式 6

30

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基であり、及びn = 1から5である。)

【請求項 1 7】

約100% 鏡像体過剰で下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを製造する方法であって、

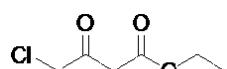


式 2

40

前記方法が、

a . 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、



式 1

b . 該エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、請求項1又は6に記載のデザイナー細胞

50

並びに0.005から0.02モル%のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接觸させる工程、

c . 工程 (b) で得られる反応混合物に、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテルから成る群から選択される有機溶媒を10 : 1 から 1 : 1 の範囲の比率で添加する工程、

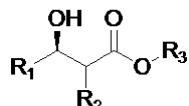
d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程、

e . 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて当該生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程を含む、前記方法。

【請求項18】

10

光学的に濃縮された下記式5の脂肪族アルコールを製造する方法であって、



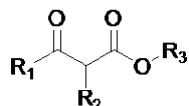
式 5

(式中、 $R_1 = CH_3$ 、 CH_2X 、 $(CH_3)_2CH$ 、 CF_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_2 = H$ 、 X 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基であり、 $X = Cl$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、及び $m = 1 - 8$ である。)、

20

前記方法が、

a. 下記式3のケトンを提供する工程、



式 3

(式中、 $R_1 = CH_3$ 、 CH_2X 、 $(CH_3)_2CH$ 、 CF_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_2 = H$ 、 X 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基であり、 $X = Cl$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、及び $m = 1 - 8$ である。)

30

b . 工程 (a) で提供される式3のケトンを、請求項 3 又は 8 に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリシン酸還元型 (NADPH) 及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

c. 工程(b)で得られる反応混合物に、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテルから成る群から選択される有機溶媒を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

e . 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

【請求項 19】

40

光学的に濃縮された下記式6のアリールアルコールを製造する方法であって、



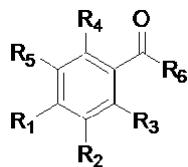
式 6

50

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基であり、及び $n = 1$ から5である。)、

前記方法が、

a . 下記式4のケトンを提供する工程、



式 4

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基であり、及び $n = 1$ から5である。)

b . 工程(a)で提供される式4のケトンを、請求項4又は9に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

c . 工程(b)で得られる反応混合物に、酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテルから成る群から選択される有機溶媒を10 : 1から1 : 1の範囲の比率で添加する工程、

d . 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

e . 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式6の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

【請求項20】

アクセッション番号MTCC No.5806、MTCC No.5807、MTCC No.5808、MTCC No.5809、MTCC No.5810、MTCC No.5811、MTCC No.5812、MTCC No.5813、MTCC No.5814、MTCC No.5815、MTCC No.5816及びMTCC No.5817のいずれかを有する、請求項1又は6に記載のデザイナー細胞。

【請求項21】

配列番号1、3、5又は7のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを含む組換えベクター構築物であって、カルボニルレダクターゼ酵素の天然に存在しない配列を含みかつ細胞表面上で高活性のカルボニルレダクターゼを発現できることを特徴とする組換えベクター構築物。

【請求項22】

配列番号1、3、5又は7及び配列番号9又は11のポリペプチド配列をコードするポリヌクレオチドを含む組換えベクター構築物であって、酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる組換えベクター構築物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全細胞生物触媒及びエナンチオ濃縮アルコールの効率的製造における前記の使用に関する。より具体的には、本発明は“デザイナー細胞”と本明細書で称する全細胞生物触媒の開発に関し、前記細胞は、種々のケトンのそれらの高鏡像体過剰アルコールへの不整還元のために極めて強化された変換速度を有する。特に、本発明はデザイナー細胞の開発に関し、前記細胞は下記式1で表されるエチル4-クロロ-3-オキソブチレートの効率的変換のために極めて強化された変換速度を有し、99.9%を超える鏡像体過剰で下記式2で表されるエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを生成する(後者は、ヒドロキシメチルグルタルリル-CoA(HMG-CoA)レダクターゼ阻害剤の製造のためにキラル構築プロック及び中間体として有用である)：

10

20

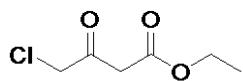
30

40

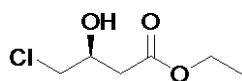
50

【0002】

【化1】



式 1



式 2

【背景技術】

【0003】

従来技術では、種々の供給源から単離した野生型全細胞生物触媒を使用して、工業的に重要な光学活性アルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）を調製する方法例が記載されている。前記種々の供給源は、例えばゲオトリチュム・カンジズム (*Geotrichum candidum*) (Sundby, E. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2003, 21, 63-66)、カンジダ・パラプシリソシス (*Candida parapsilosis*) (Kaliaperumal, T. et al. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 2010, 37, 159-165)、カンジダ・マグノリアエ (*Candida magnoliae*) (Yasohara, Y. et al. *Applied Microbiology and Biotechnology* 1999, 51, 847-851)、シリンドロカルポン・スクレロチゲヌム (*Cylindrocarpon sclerotigenum*) (Saratani, Y. et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2001, 65, 1676-1679)、クルベロミセス・ラクチス (*Kluveromyces lactis*) (Yamamoto, H., et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2002, 66, 1775-1778)、クルベロミセス・アエスツアリイ (*Kluveromyces aestuarii*) (Yamamoto, H. et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2004, 68, 638-649)、アウレオバシジウム・プルーランス (*Aureobasidium pullulans*) (He, J.Y. et al. *Process Biochemistry* 2006, 41, 244-249)、ピキア・スチピチス (*Pichia stipitis*) (Ye, Q. et al. *Biotechnology Letters* 2009, 31, 537-542)、及びストレプトミセス・コエリコロル (*Streptomyces coelicolor*) (Wang, L.J. et al. *Bioresource Technology* 2011, 102, 7023-7028) である。さらにまた、野生型全細胞生物触媒を使用するエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの製造方法が、米国特許99/5891685号；米国特許97/5700670号；米国特許96/5559030号；米国特許95/5413921号；米国特許90/4933282号；及び米国特許号87/4710468に開示されている。カルボニル基を対応するアルコールに還元する野生型微生物の使用を記述した方法はあるが、これら的方法は欠点（例えば低効率、低基質濃度、低光学純度など）を有する。したがって、工業的に重要な光学活性アルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）を野生型の天然の全細胞生物触媒を用いて合成することは実際的ではない。

【0004】

さらにまた、工業的に重要な光学活性アルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）の光学純度を改善する公知の方法は、手を加えられていない例えば以下の供給源から精製された酵素の使用を含む：カンジダ・マグノリアエ (Wada, M. et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 1998, 62, 280-285)、スプロボロミセス・サルモニコロル (*Sporobolomyces salmonicolor*) (Kita, K. et al. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1999, 6, 305-313)、クルベロミセス・ラクチス (Yamamoto, H. et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2002, 66, 1775-1778)、クルベロミセス・アエスツアリイ (Yamamoto, H. et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2004, 68, 638-649)、ピキア・スチピチス (Ye, Q., et al. *Bioresource Technology* 2009, 100, 6022-6027)、及びストレプトミセス・コエリコロル (Wang, L.J. et al. *Bioresource Technology* 2011, 102, 7023-7028)。

【0005】

カルボニルレダクターゼ活性を有する精製酵素又は形質転換体がケトン（エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートを含む）のカルボニル基を還元するとき、前記は、工業的に重要な光学活性アルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）の調製

10

20

30

40

50

に補酵素、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチド還元型（NADH）又はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）を要求する。反応が進行するにつれて、補酵素はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）又はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）に変換される。補因子再生系が存在しない場合、理論量の增量補因子が要求される。しかしながら、反応が補因子再生系の存在下で行われるとき、増量される補酵素の量は大幅に削減される。補因子再生系は典型的には、その基質の存在下でニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）又はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）をニコチニアミドアデニンジヌクレオチド還元型（NADH）又はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）に変換する酵素から成る。補酵素再生能力は、精製酵素の使用によって達成されるか（Yasohara, Y. et al. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 2000, 64, 1430-1436 ; Kaluzna, I.A. et al. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126, 12827-12832 ; Zhu, D. et al. *The Journal of Organic Chemistry* 2006, 71, 4202-4205 ; Ye, Q. et al. *Biotechnology Letters* 2009, 31, 537-542）、又はその細胞質で補酵素再生能力を有する形質転換体を使用することによって達成され得る（Xu, Z. et al. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2006, 70, 40-46 ; Zhang, J. et al. *Chemical Communications* 2006, 398-400）。 10

【 0 0 0 6 】

複数の方法（例えば遺伝子シャッフリングを用いるin vitro遺伝子進化）を利用して、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートを不整還元するケトレダクターゼの活性が約13倍改善され、さらに基質としてグルコースを用い補因子（ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）又はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH））をリサイクルするグルコースデヒドロゲナーゼの能力が対応する野生型酵素と比較して約7倍改善された（Steve K. Ma et al. *Green Chemistry* 2010, 12, 81-86米国特許10/0028972号；米国特許10/7816111号）。 20

しかしながら、単離酵素の使用は追加の工程（例えば酵素の単離、精製及び安定化）を要求し、前記は、コストの追加をもたらし、さらに光学活性アルコールの製造の全プロセスの経済的魅力を損なう。そのうえ、基質及び／又は生成物による酵素の阻害が時に生じ得る。2つの酵素（1つはカルボニル化合物の還元用及び他方は補因子リサイクリング用）を2つの基質（各酵素について1つの基質）と一緒に使用することは当該反応において全体の複雑な消長動態をもたらす。総合すれば、これらの要因は、鏡像体的に濃縮されたアルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）の調製で全細胞を使用する場合と比べて単離酵素の使用の価値を低下させる。 30

【 0 0 0 7 】

野生型株に付随する低効率の問題を克服するために、カルボニルレダクターゼ活性をコードする遺伝子を推論し、宿主細胞で過剰発現させることができる。鏡像体濃縮アルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）を製造するために、全細胞生物触媒の更なる効率改善が、同じ宿主細胞の細胞質でカルボニルレダクターゼ及び補酵素再生能力の両方を共同発現させることによって達成される（Kizaki, N. et al. *Applied Microbiology and Biotechnology* 2001, 55, 590-595, Kataoka, M. et al. *Enzyme and Microbial Technology* 2006, 38, 944-951; Ye, Q. et al. *Bioresource Technology* 2010, 101, 6761-6767）。 40

しかしながら、カルボニルレダクターゼ能力が存在する形質転換体又はカルボニルレダクターゼ及び補酵素再生能力の両方が細胞の細胞質に存在する形質転換体のいずれかを使用する方法では、複数の欠点（例えば形質膜によって強制される障壁による基質取り込み及び生成物流出における低効率、全プロセスの複雑な消長動態）に悩まされる。

結果として、光学的に純粋なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレート及び他の光学的に濃縮されたアルコールを製造する現行方法は、欠点（例えば低効率、低生産性など）を抱え、したがって前記は製造コストの上昇を生じる。

【 0 0 0 8 】

タンパク質（酵素を含む）を細胞の表面で発現させる技術は周知であり（Lee, S.Y. et al. Trends in Biotechnology 2003, 21, 45-52）、広範囲のバイオテクノロジー及び工業における応用で用いられている。前記応用は、例えばバイオ変換のための全細胞生物触媒（Shimazu, M. et al. Protein Biotechnology Progress 2001, 17, 76-80; Shimazu, M. et al. Biotechnology and Bioengineering 2001, 76, 318-324）、有害な化学物質及び重金属を除去するバイオ吸着材（Bae, W. et al. Biotechnology and Bioengineering 2000, 70, 518-524; Bae, W. et al. J Inorg Biochem 2002, 88, 223-227; Sousa, C. et al. J. Bacteriol. 1998, 180, 2280-2284; Xu, Z. et al. Appl Environ Microbiol 1999, 65, 5142-5147）、ヒト抗体ライブラリーのスクリーニング（Chao, G. et al. Nat. Protocols 2006, 1, 755-768）、変異の検出（Aoki, T. et al. Analytical Biochemistry 2002, 300, 103-106）、酵素、受容体又は他のシグナル感受性成分を固着させることによるバイオセンサーの開発（Dhillon, J.K. et al. Letters in Applied Microbiology 1999, 28, 350-354; Shibasaki, S. et al. Applied Microbiology and Biotechnology 2001, 57, 702-707; Shibasaki, S.S. et al. Applied Microbiology and Biotechnology 2001, 57, 528-533）である。
10

【0009】

もっと最近では、標的タンパク質（デヒドロゲナーゼを含むがカルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを含まない）の同時ディスプレーのための方法が米国特許11/7897366号に開示された。通常では、標的ペプチド又はタンパク質（パッセンジャー・タンパク質）に融合させた細胞表面タンパク質又はそれらの切端形（担体タンパク質）が、表面でのタンパク質のディスプレーに用いられる。グラム陰性（大腸菌（Escherichia coli））、グラム陽性（枯草菌（Bacillus subtilis）、ブドウ球菌属（Staphylococcus）株）細菌及び酵母（サッカロミセス・セレビシアエ（Saccharomyces cerevisiae）、ピキア・パストリス（Pichia pastoris））が、表面での異種タンパク質発現のディスプレーのために開発されている。グラム陽性細菌の細胞壁の硬質構造は当該細菌を適切な宿主とするが、しかしながらグラム陰性大腸菌は最も人気があり、細胞表面ディスプレーのために大いに開発してきた。大腸菌の必須タンパク質（例えばLamB、FhuA並びにポリンOmpA、OmpC及びOmpX（前記は外膜に構造的な硬さを与える））が、細胞外ループに短いアミノ酸配列（60アミノ酸まで）を挿入し細胞表面でディスプレーするために重点的に用いられている。外膜リポタンパク質は小さな脂質改変アミノ末端によって膜に固着される。最初のリポタンパク質系細胞表面ディスプレーはLpp-OmpAキメラであり、前記は20アミノ酸シグナル配列及び成熟大腸菌リポタンパク質の最初の9つのN-末端残基から成り、大腸菌外膜タンパク質A（OmpA）の残基46 - 159がパッセンジャー・タンパク質のN-末端に融合された。

20

【発明の概要】

【0010】

本発明は、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する大腸菌を提供し、前記細胞は、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの還元のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍強化された変換速度を有する。

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の不整還元のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から275倍強化された変換速度を有する。
40

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の還元のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して単位細胞質量当たり約3倍から26倍強化された変換速度を有する。

別の特徴では、本発明は、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株の提供を目的とし、前記は、大腸菌細胞の細胞質でCRS及びGDHを同時に発現する大腸菌株と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たりのエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに還元する変換速
50

度は250倍から300倍強化され、さらにGDHポリペプチドの単位質量当たりのグルコースをグルコネートに酸化する能力は200倍から250倍強化される。

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株は、種々のケトンの還元のために細胞の細胞質でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、CRSタンパク質の単位質量当たりの変換速度は約50倍から270倍強化される。

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の還元のために細胞の細胞質でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、単位細胞質量当たりの変換速度は約3倍から24倍強化される。 10

【0011】

ある実施態様では、種々のケトンは式3で表される脂肪族化合物であり、式中R₁はCH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂はH、X又はCH₃(CH₂)_nであり、さらにR₃はアルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、XはCl又はBrであり、さらにnは1-4であり、mは1-8である。

より好ましい実施態様では、R₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、さらにR₃は(CH₂)₇CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はClであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCF₃であり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁は(CH₃)₂CHであり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃である。 20

別の実施態様では、種々のケトンは一般式4で表される芳香族化合物であり、式中R₁=R₂=R₃=R₄=R₅=H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、さらにR₆はアルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、nは1から5である。

ある実施態様では、大腸菌は、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)、又は大腸菌C43(DE3)から選択される。

【0012】

好ましい実施態様では、補因子としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)を用いるエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換の速度は、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する大腸菌株BL21(DE3)を、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する大腸菌株C41(DE3)に取り替えると1.3倍高い。 30

別の好ましい実施態様では、補因子としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)を用いるエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換の速度は、細胞の表面でCRSポリペプチドのみを発現し補因子リサイクリングのために外部GDHの添加を必要とする大腸菌株BL21(DE3)と比較して、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する大腸菌株C41(DE3)で約1.6倍高い。

具体的な実施態様では、本発明は、工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを高い生産性及び少なくとも150g l⁻¹の生成物蓄積とともに約100%の鏡像体過剰で生産する製造方法を提供する。 40

【図面の簡単な説明】

【0013】

【図1】基質として適切な化合物の例である。

【図2】生成物として適切な化合物の例である。

【図3】配列番号:1、3、5又は7に対応する“CRSポリペプチド”構築物の模式図である。配列は、(i)成熟大腸菌リポタンパク質(Lpp)の最初の9つのN-末端残基と連結されたN-末端20アミノ酸のシグナル配列、(ii)大腸菌外膜タンパク質A(OmpA)の残基46-159(前記はそのC末端に融合されるパッセンジャータンパク質を膜を通して輸送すると期待される)、及び(iii)CRSの完全配列(ここでCRSは、カンジダ・マグノリアエの野生型カルボニルレダクターゼ(配列番号:13)又は改変カルボニルレダクターゼ(配列番号:50

15、17又は19（前記はいくつかのアミノ酸置換を有することで配列番号:13と異なる））である）から成る。最初の29アミノ酸残基（シグナル+Lppペプチド）はGly-Ileリンカーを介して114アミノ酸のOmpA残基と連結され、前記リンカーは続いてGly-Ile-Pro-Glyを介してCRSのN-末端に貼付される。

【図4】配列番号:9又は11に対応する“GDHポリペプチド”構築物の模式図である。配列は、(i)成熟大腸菌リボタンパク質(Lpp)の最初の9つのN-末端残基と連結されたN-末端20アミノ酸のシグナル配列、(ii)大腸菌外膜タンパク質A(OmpA)の残基46-159(前記はそのC末端に融合されるパッセンジャータンパク質を膜を通過して輸送すると期待される)、及び(iii)GDHの完全配列(ここでGDHはバシリス・メガテリウム(Bacillus megaterium)の野生型グルコースデヒドロゲナーゼ(配列番号:21)又は改変グルコースデヒドロゲナーゼ(配列番号:23(前記はいくつかのアミノ酸置換を有することで配列番号:21と異なる))である)から成る。最初の29アミノ酸残基(シグナル+Lppペプチド)はGly-Ileリンカーを介して114アミノ酸のOmpA残基と連結され、前記リンカーは続いてGly-Ile-Pro-Glyを介してGDHのN-末端に貼付される。

【図5】組換えベクターpET23(a)-omp-CRSに関する方法及び構造である。

【図6】組換えベクターpETDuet1-omp-CRS, omp-GDHに関する方法及び構造である。

【図7】大腸菌細胞の表面でCRSを発現する‘デザイナー全細胞生物触媒’の透過型電子顕微鏡写真である。細胞をウサギ抗CRSポリクローナル抗体で続いてナノゴールド標識ヤギ抗ウサギIgG(全分子)二次抗体でプローブ精査した。矢印は金粒子を指す。図7aは、大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)(すなわち陰性コントロール(金標識を全く示さない))のTEMである。図7bは、大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS(CRSを発現する(強烈な金標識を示す))のTEMを示す。

【発明を実施するための形態】

【0014】

本発明は種々の改変及び/又は代替プロセス及び/又は組成物に鋭敏ではあるが、その具体的な実施態様は絵図/図及び表における実例によって示されており、さらに下記に詳細に記載されるであろう。しかしながら、本発明を特定のプロセス及び/又は開示組成物に限定しようとするものではないことは理解されるべきであり、反対に、本発明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の趣旨及び範囲内に含まれる全ての改変、等価物及び代替物をカバーしようとするものである。

グラフ、図、表及びプロトコルは、適切な場合には絵図での通常的な表現によって表されているが、それらは、本明細書の記載が役立つ当業者には容易に明瞭となる詳細な開示を不明確にしないように、本発明の実施態様の理解に適切な具体的な詳細を単に示す。

以下の記載は単に典型的な実施態様であり、本発明の範囲、応用性又は構成をいかなる態様においても制限しようと/orするものではない。そうではなく、以下の記載は本発明の典型的な実施態様を実行する便利な例示を提供する。記載した実施態様に対する多様な変更を記載した成分の機能及び配置において本発明の範囲から逸脱することなく実施できる。

“comprises”、“comprising”という用語又は前記用語の任意の他の変型は非排他的包含をカバーし、したがって、“comprises...a”に続く1つ以上のプロセス又は組成物又は系又は方法は、それ以上の拘束を受けずに他のプロセス、サブプロセス、組成物、サブ組成物、マイナーな若しくはメジャーな組成物又は他の成分又は他の構造物、又は追加のプロセス若しくは組成物、又は追加の成分、又は追加の特色、又は追加の特徴、又は追加の属性を排除しない。

【0015】

定義

本発明の目的のために、下記用語はそこで特定される意味を有するであろう。

“CRSポリペプチド”は、図3に模式的に示されるアミノ酸配列を指す。

“GDHポリペプチド”は、図4に模式的に示される配列を指す。

“カルボニルレダクターゼ”及び“CRS”は互換的に用いられ、ケトン及びニコチンアミドアデニジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)を対応するアルコール及びニコチン

10

20

30

40

50

アミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）に変換するポリペプチドを指す。

“グルコースデヒドロゲナーゼ”及び“GDH”は互換的に用いられ、グルコース及びニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）をグルコネート及びニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）に変換するポリペプチドを指す。

本記述では、“デザイナー細胞”という用語は本明細書では大腸菌の組換え株を指し、前記は、還元剤として還元ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）の触媒量を用い、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）への酸化のための外部補因子リサイクリング系の存在下又は非存在下で種々のケトンの不整還元を触媒して鏡像体濃縮アルコールを生成する。

10

【0016】

さらにまた、“補因子リサイクリング系”は、本明細書では使用済み補因子を反応前の状態に戻すために反応に添加される試薬一式を指す。例えば、CRSによるケトンからアルコールへの変換では、補因子ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）はニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）（使用済み補因子）に変換される。試薬、GDH及びグルコースの反応への添加は、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）からニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）の再生をもたらすであろう。

さらにまた、“CRSポリペプチド”という用語は図3に模式的に示されるアミノ酸配列を指し、前記図では、CRSは、カンジダ・マグノリアエの野生型カルボニルレダクターゼ配列番号:13又はいくつかのアミノ酸置換を有することによって配列番号:13とは異なる改変カルボニルレダクターゼ、例えば配列番号:15（P14A、S42N、A194V、I275V）又は配列番号:17（P14A、S42N、V147A、A194V、E234G）又は配列番号:19（E9G、P14A、N20S、S42N、T190A、A194V、E234G）である。

20

さらにまた、GDHポリペプチドは図4に模式的に示される配列を指し、前記図では、GDHは、バシリス・メガテリウムの野生型グルコースデヒドロゲナーゼ配列番号:21又はいくつかのアミノ酸置換を有することによって配列番号:21とは異なる改変グルコースデヒドロゲナーゼ、例えば配列番号:23（S16T、E170K、P194T、A197K、E222D、S237C）である。

【0017】

本明細書で用いられるように、“カルボニルレダクターゼ”及び“CRS”という用語は互換的に用いられ、ケトン及びニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）を対応するアルコール及びニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）に変換するポリペプチドを指す。さらにまた、“グルコースデヒドロゲナーゼ”及び“GDH”という用語は互換的に用いられ、グルコース及びニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）をグルコネート及びニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）に変換するポリペプチドを指す。

30

本発明は、“デザイナー細胞”と本明細書で称する全細胞生物触媒を提供する。前記は、種々のケトンのそれらの高鏡像体過剰アルコールへのエナンチオ選択性変換のために極めて強化された変換速度を有する。特に本発明はデザイナー細胞の開発に関し、前記細胞は、式1によって表されるエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを効率的に変換して、99.9%を超える鏡像体過剰で式2によって表されるエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを生成するために極めて強化された変換速度を有する（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートはヒドロキシメチルグルタル-CoA（HMG-CoA）レダクターゼ阻害剤の製造のためにキラル構築ブロック及び中間体として有用である）。

40

【0018】

本発明は、カルボニルレダクターゼポリペプチド（CRS）の細胞表面での発現を提供する。さらにまた、本発明は、カルボニルレダクターゼポリペプチド（CRS）及びグルコースデヒドロゲナーゼ（GDH）の細胞表面での共同発現もまた提供する。したがって、本発明は細胞質でカルボニルレダクターゼを発現する全細胞系の既存の欠点を克服し、カルボニルレダクターゼポリペプチド（CRS）は細胞の表面に固着され、エチル-4-クロロ-3-オ

50

キソブチレートを工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに変換するため同じ細胞宿主の細胞質で発現されるカルボニルレダクターゼと比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり予想を超える驚異の強化変換速度を示す。同様に、本発明はまた細胞質でCRS及びGDH酵素を共同発現する全細胞系の既存の欠点を克服し、共同発現は予想を超える驚異の強化発現を示す。さらにまた、そのような態様で発現される酵素は、純粋な固定化酵素に類似する態様を示し、それによって該酵素のコスト集約的な単離、精製及び安定化の要請を不要にすると期待される。さらにまた、消長動態は、細胞質膜を通過する基質の取り込み及び生成物の流出がこの場合には不要であるという事実のためにはるかに単純であることが予想される。

【0019】

10

驚くべきことに、本発明は、デザイナー細胞の効率性はCRS及びグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)活性の双方が同じ宿主で共同発現される場合に一層改善され得るという仮説により機能し、これは多分、そのような生物触媒とともに、補因子(ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)/ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP))は溶液中に完全に遊離されるのではなく、むしろ該補因子は細胞の表面で非常に近接して配置されるCRSとGDHとの間を水路で運ばれるためであろう。

したがって、本発明は、酵素カルボニルレダクターゼ及び補酵素再生系(例えばグルコースデヒドロゲナーゼ)が細胞の表面で一緒に共同発現される設計された形質転換体を提供し、前記形質転換体は、細胞の表面でCRSのみを発現しエチル(S)-4-クロロ-3-オキソブタノエートからエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換に補酵素リサイクリング系のためのGDHの外部添加を必要とする形質転換体と比較して、効率が数倍改善される。

20

本発明は、高生産性及び少なくとも 150g l^{-1} の生成物蓄積を示す、工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約100%鏡像体過剰の製造方法を提供する。

本発明はまた、種々のケトンの不整還元を触媒して鏡像体濃縮アルコールを製造する、大腸菌の組換え株である‘デザイナー細胞’を提供し、前記は、還元剤として還元ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)の触媒量を、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)からニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)への酸化のための補因子リサイクリング系の添加下又は非添加下で用いる。カンジダ・マグノリアエの当該株はAKU4643であり、バシリス・メガテリウムはDSM2894である。

30

【0020】

本発明は、配列番号:1、3、5又は7に対応する“CRS”ポリペプチド構築物を含むデザイナー細胞を提供する。本発明に記載するデザイナー細胞は、(a)成熟大腸菌リポタンパク質(Lpp)の最初の9つのN-末端残基に連結されたN-末端20アミノ酸シグナル配列；(b)大腸菌外膜タンパク質A(OmpA)の残基46-159(前記はそのC-末端に融合されたパッセンジャータンパク質を当該膜を通過して輸送すると期待される)；及び(c)CRSの全配列を有し、ここで、CRSは、カンジダ・マグノリアエの野生型カルボニルレダクターゼ、配列番号:13又は改変カルボニルレダクターゼ、配列番号:15、17又は19(いくつかのアミノ酸置換を有することによって配列番号:13と異なる)である。最初の29アミノ酸残基のシグナル+LppペプチドはGly-Ileリンカーを介して114アミノ酸のOmpA残基に連結され、前記は続いてCRSのN-末端にGly-Ile-Pro-Glyを介して貼り付けられた(図3)。いくつかのアミノ酸置換を有することによって配列番号:13と異なる改変カルボニルレダクターゼは、例えば配列番号:15(P14A、S42N、A194V、I275V)又は配列番号:17(P14A、S42N、V147A、A194V、E234G)又は配列番号:19(E9G、P14A、N20S、S42N、T190A、A194V、E234G)である。

40

【0021】

本発明はまた、配列番号:9又は11に対応する“GDH”ポリペプチド構築物を含むデザイナー細胞を提供する。本発明に記載するデザイナー細胞は、(a)成熟大腸菌リポタンパク質(Lpp)の最初の9つのN-末端残基に連結されたN-末端20アミノ酸シグナル配列；(b)

50

) 大腸菌外膜タンパク質A(OmpA)の残基46 - 159(前記はそのC-末端に融合されたパッセンジャー・タンパク質を当該膜を通過して輸送すると期待される);及び(c)GDHの全配列を有し、ここで、GDHは、バシルス・メガテリウムの野生型グルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)、配列番号:21又は改変カルボニルレダクター、配列番号:23(前記はいくつかのアミノ酸置換を有することによって配列番号:21と異なる)である。最初の29アミノ酸残基のシグナル+LppペプチドはGly-Ileリンカーを介して114アミノ酸のOmpA残基と連結され、前記リンカーは続いてGly-Ile-Pro-Glyを介してCRSのN-末端に貼付された(図3)。いくつかのアミノ酸置換を有することによって配列番号:21と異なる改変グルコースデヒドロゲナーゼは、例えば配列番号:23(S16T、E170K、P194T、A197K、E222D、S237C)である。

10

本発明はまた、使用済み補因子をその反応前の状態に戻すために反応に添加される補因子リサイクリング系(本明細書では一式の試薬を指す)を提供する。例えば、デザイナー細胞によるケトンからアルコールへの変換で、補因子ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)はニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)(使用済み補因子)に変換される。試薬、GDH及びグルコースの反応への添加は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)からニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の再生をもたらすであろう。

【0022】

本明細書に提示する発明は多数の特徴を有する。ある特徴では、本発明は、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する組換え大腸菌株の構築を目的とし、前記組換え大腸菌は、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートのエチル-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの還元のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の吸収の低下によって測定したときCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍強化された変換速度を有する。CRSの相対的な量は免疫プロットによって決定した(実施例7)。

20

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の変換のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の吸収の低下によって測定したときCRSタンパク質の単位質量当たり約50倍から275倍強化された変換速度を有する。相対的なCRSタンパク質含有量は免疫プロットによって決定した(実施例7)。

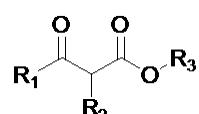
30

【0023】

ある実施態様では、ケトンは下記式3によって表される脂肪族化合物である:

【0024】

【化2】



式 3

40

【0025】

式中R₁はCH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂はH、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃はアルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、XはCl又はBrであり、nは1-4であり、さらにmは1-8である。

好ましい実施態様では、R₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、R₃は(CH₂)₇CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はClであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCF₃であり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁は(CH₃)₂CHであり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃である。

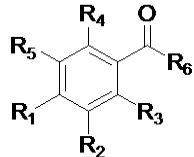
【0026】

50

別の実施態様では、ケトンは下記式4で表される芳香族化合物である：

【0027】

【化3】



式 4

【0028】

10

式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。

本明細書で記述するように、CRS活性の比較に用いられる従来技術の大腸菌は、カンジダ・マグノリアエの野生型カルボニルレダクターゼ配列番号:13又は改変カルボニルレダクターゼポリペプチド配列番号:15、配列番号:17又は配列番号:19を細胞質で発現する大腸菌株を指す。これらの大腸菌株は米国特許2010/0028972で開示される技術を用いて構築された。

【0029】

20

別の特徴では、本発明は、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する組換え大腸菌株の構築を目的とし、前記は、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートのエチル-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの還元のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の吸収の低下によって測定したとき単位細胞質量当たり15倍から26倍強化された変換速度を有する。

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の還元のために細胞の細胞質でCRSを発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の吸収の低下によって測定したとき単位細胞質量当たり約3倍から26倍強化された変換速度を有する。

ある実施態様では、ケトンは式3で表される脂肪族化合物であり、式中 R_1 は CH_3 、 CH_2X 、 $(CH_3)_2CH$ 、 CF_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 R_2 は H 、 X 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、さらに R_3 はアルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_m$ であり、 X は Cl 又は Br であり、さらに n は1-4であり、 m は1-8である。

より好ましい実施態様では、 R_1 は CH_2Cl であり、 R_2 は H であり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は CH_3 であり、 R_2 は H であり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は CH_2Cl であり、 R_2 は H であり、 R_3 は $(CH_2)_7CH_3$ であるか、又は R_1 は CH_3 であり、 R_2 は Cl であり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は CF_3 であり、 R_2 は H であり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は $(CH_3)_2CH$ であり、 R_2 は H であり、 R_3 は CH_2CH_3 である。

別の実施態様では、ケトンは一般式4で表される芳香族化合物であり、式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基、例えば C_6H_5 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。

【0030】

40

なお別の特徴では、本発明は、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株の構築を目的とし、前記は、大腸菌細胞の細胞質でCRS及びGDHを同時に発現する大腸菌株と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たりのエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに還元する変換速度は250倍から300倍強化され、さらにGDHポリペプチドの単位質量当たりのグルコースをグルコネートに酸化する能力は200倍から250倍強化される。CRS活性は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の吸収の低下によって測定した。相対的なCRSポリペプチドの量は免疫プロットによって決定した(実施例7)。GDH活性及び

50

相対的なGDHポリペプチド量は実施例11に記載するように決定した。

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の還元のために細胞の細胞質でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）の吸収の低下によって測定したときCRSタンパク質の単位質量当たり約50倍から270倍強化された変換速度を有する。相対的なCRSたんぱく質含有量は免疫プロットによって決定した（実施例7）。

ある実施態様では、ケトンは式3で表される脂肪族化合物であり、式中R₁はCH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂はH、X又はCH₃(CH₂)_nであり、さらにR₃はアルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり（式中nは1-8である）、XはCl又はBrであり、nは1-4であり、さらにmは1-8である。
10

より好ましい実施態様では、R₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、R₃は(CH₂)₇CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はClであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCF₃であり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁は(CH₃)₂CHであり、R₂はHであり、R₃はCH₂CH₃である。

別の実施態様では、ケトンは一般式4で表される芳香族化合物であり、式中、R₁=R₂=R₃=R₄=R₅=H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆=アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n=1から5である。
20

【0031】

本明細書に記述するように、CRS及びGDH活性の比較に用いられる従来技術の大腸菌は、カンジダ・マグノリアエの野生型カルボニルレダクターゼ配列番号:13及びバシリス・メガテリウムの野生型グルコースデヒドロゲナーゼ配列番号:21を細胞質で共同発現する大腸菌株に該当する。これらの大腸菌株は以下の文献に開示された技術を用いて構築された（Kizaki, N. et al. Applied Microbiology and Biotechnology 2001, 55, 590-595）。さらにまた、前記は、配列番号:15、配列番号:17又は配列番号:19から選択される変種カルボニルレダクターゼ、及び配列番号:21配列番号:23から選択される変種グルコースデヒドロゲナーゼを細胞質で共同発現する大腸菌株に該当する。これらの大腸菌株は、ペプチド配列、これらペプチド配列をコードする対応ヌクレオチド配列及び発現ベクターに関して以下の文献に開示された情報に基づいて構築された：Applied and Microbial Technology, 55:5590-595(2001)；米国特許2010/0028972及び米国特許2010/7816111。
30

【0032】

別の特徴では、本発明は、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株の構築を目的とし、前記は、大腸菌細胞の細胞質でCRS及びGDHを同時に発現する大腸菌株と比較して、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの還元について単位細胞質量当たり11倍倍から24倍強化された活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量当たり9倍から31倍強化された活性を有する。CRS活性は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）の吸収の低下によって測定した。GDH活性は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）の吸収の低下によって測定した（実施例11）。
40

ある実施態様では、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する組換え大腸菌株は、種々のケト化合物の還元のために細胞の細胞質でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する従来技術の対応する大腸菌株と比較して、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）の吸収の低下によって測定したとき単位細胞質量当たり約3倍から24倍強化された変換速度を有する。

ある実施態様では、ケトンは式3で表される脂肪族化合物であり、式中R₁はCH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂はH、X又はCH₃(CH₂)_nであり、さらにR₃はアルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり（式中nは1-8である）、XはCl又はBrであり、nは1-4であり、さらにmは1-8である。
50

より好ましい実施態様では、 R_1 は CH_2Cl であり、 R_2 はHであり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は CH_3 であり、 R_2 はHであり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は CH_2Cl であり、 R_2 はHであり、 R_3 は $(CH_2)_7CH_3$ であるか、又は R_1 は CH_3 であり、 R_2 は Cl であり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は CF_3 であり、 R_2 はHであり、 R_3 は CH_2CH_3 であるか、又は R_1 は $(CH_3)_2CH$ であり、 R_2 はHであり、 R_3 は CH_2CH_3 である。

別の実施態様では、ケトンは一般式4で表される芳香族化合物であり、式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、F、Cl、Br、I、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基、例えば C_6H_5 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。

【0033】

したがって、本発明の目的は、配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択され配列リストの配列番号:1、3、5又は7のアミノ酸配列に1つ又はいくつかのアミノ酸の欠失、置換又は付加を含む、形質転換体の表面で発現されるアミノ酸配列を有し、カルボニルレダクターゼ活性を有するデザイナー細胞を提供することである。
10

上記ポリペプチドをコードする本発明のDNAは、配列リストの配列番号:2、4、6又は8から選択されるヌクレオチド配列を有する。

上記ポリペプチドをコードする本発明のプラスミドはpET23(a)-omp-CRSである。

本記載中では、アミノ酸配列は奇数を割り当てられている。具体的なアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は直ぐ次の偶数を割り当てられている。例えば、配列番号:1のアミノ酸については、対応するコードヌクレオチド配列は配列番号:2の配列を割り当てられている。
20

形質転換体を作製するために本発明にしたがって用いられる細胞は、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)又は大腸菌C43(DE3)から選択される。

本発明にしたがって用いられる形質転換細胞は、上記プラスミドpET23(a)-omp-CRSで形質転換される細胞の形質転換体である。

好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSである。

より好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌C41(DE3)+pET23(a)-omp-CRSである。
。

【0034】

好ましい実施態様では、デザイナー細胞は、配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列に1つ又はいくつかのアミノ酸の欠失、置換又は付加を含む、形質転換体の表面で発現される配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列を有し、カルボニルレダクターゼ活性を有する。
30

上記ポリペプチドのDNAは配列番号:2のヌクレオチド配列を有する。

上記ポリペプチドをコードする本発明のプラスミドはpET23(a)-omp-CRSである。

形質転換体を作製するために本発明にしたがって用いられる細胞は、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)又は大腸菌C43(DE3)から選択される。

本発明にしたがって用いられる形質転換細胞は、上記プラスミドpET23(a)-omp-CRSで形質転換される細胞の形質転換体である。

好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSである。

より好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌C41(DE3)+pET23(a)-omp-CRSである。
。

【0035】

工業的に重要で光学的に純粋なアルコール（エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む）を製造するために基質（エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートを含む）のカルボニル基を不整還元する、本発明の形質転換体は補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）を要求する。反応が進行するにつれて、補酵素は酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）に変換される。酸化型から還元型への変換は、補酵素再生能力を有する別の酵素（例えばグルコースデヒドロゲナーゼ）を必要とする。

ある実施態様では、グルコースデヒドロゲナーゼはバシリス・メガテリウムから誘導さ
50

れる。

本発明の別の目的は、形質転換体の表面で2つのポリペプチド（一方はCRS活性を有し、他方はGDH活性を有する）を共同発現するデザイナー細胞を提供することである。前記CRS活性を有するポリペプチドは、配列リストの配列番号:1、3、5又は7のアミノ酸配列に1つ又はいくつかのアミノ酸の欠失、置換又は付加を含む、配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択されるアミノ酸配列を有し、前記は効率的にエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを還元し、さらに他方のポリペプチドは、配列リストの配列番号:9又は11のアミノ酸配列に1つ又はいくつかのアミノ酸の欠失、置換又は付加を含む、配列リストの配列番号:9又は11から選択されるアミノ酸配列を有し、光学的に純粋なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの製造のために補酵素再生活性を有する。

10

【 0 0 3 6 】

カルボニルレダクターゼ活性を有する上記ポリペプチドをコードする本発明のDNAは、配列リストの配列番号:2、4、6又は8から選択されるヌクレオチド配列を有し、補酵素再生酵素をコードする本発明のDNAは配列リストの配列番号:10又は12から選択されるヌクレオチド配列を有する。

カルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生能力を有する両ポリペプチドをコードする本発明のプラスミドはpETDuet1-omp-CRS,omp-GDHである。

本発明にしたがって用いられる形質転換細胞は、上記プラスミドpETDuet1-omp-CRS,omp-GDHで形質転換される細胞の形質転換体である。

20

カルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生能力の双方を有する形質転換体を作製するために本発明にしたがって用いられる細胞は、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)又は大腸菌C43(DE3)から選択される。

好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDHである。

より好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDHである。

【 0 0 3 7 】

好ましい実施態様では、形質転換体の表面で2つのポリペプチド（一方はCRS活性を有し、他方はGDH活性を有する）を共同発現する形質転換体は、配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列に1つ又はいくつかのアミノ酸の欠失、置換又は付加を含む、配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列を有し、前記は効率的にエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを還元し、さらに他方のポリペプチドは、配列リストの配列番号:9のアミノ酸配列に1つ又はいくつかのアミノ酸の欠失、置換又は付加を含む、配列リストの配列番号:9のアミノ酸配列を有し、光学的に純粋なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの製造のために補酵素再生活性を有する。

30

カルボニルレダクターゼ活性を有する上記ポリペプチドをコードする本発明のDNAは、配列リストの配列番号:2のヌクレオチド配列を有し、補酵素再生酵素をコードする本発明のDNAは配列リストの配列番号:10のヌクレオチド配列を有する。

カルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生能力を有する両ポリペプチドをコードする本発明のプラスミドはpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHである。

40

本発明にしたがって用いられる形質転換細胞は、上記プラスミドpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHで形質転換される細胞の形質転換体である。

好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDHである。

カルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生能力の双方を有する形質転換体を作製するために本発明にしたがって用いられる細胞は、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)又は大腸菌C43(DE3)から選択される。

より好ましい実施態様では、形質転換細胞は大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDHである。

【 0 0 3 8 】

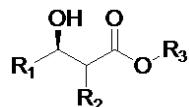
50

本発明の別の目的は、工業的に重要で光学的に活性なアルコールを製造するための製造方法を提供することであり、前記は、形質転換体の培養条件、培養の採集、カルボニル基を有する基質のための反応条件、及び製造された光学的に活性なアルコールの採集を含む。

ある実施態様では、ケトンは式3で表される脂肪族化合物であり、生成される光学的に活性なアルコールは下記式5で表される：

【0039】

【化4】



10

式5

【0040】

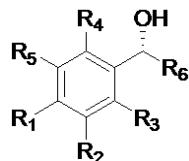
式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。

より好ましい実施態様では、R₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCH₂Clであり、R₂はHであり、さらにR₃は(CH₂)₇CH₃であるか、又はR₁はCH₃であり、R₂はClであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁はCF₃であり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃であるか、又はR₁は(CH₃)₂CHであり、R₂はHであり、さらにR₃はCH₂CH₃である。

別の実施態様では、ケトンは式4で表される芳香族化合物であり、生成される光学的に活性なアルコールは下記式6で表される：

【0041】

【化5】



20

30

式6

【0042】

式中R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆はアルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、さらにnは1から5である。

【0043】

デザイナー全細胞生物触媒は遠心分離又はろ過によって発酵プロセスから単離できる。単離された生物触媒はそのようなものとして又は凍結乾燥粉末として用いることができる。カルボニル化合物からヒドロキシル化合物へのバイオ転換のために、生物触媒は、pH5.0 - 9.0（最適にはpH6.5）の適切な緩衝剤中に、10 - 45（最適には30）の温度で懸濁させることができる。最適には、溶剤（例えばジエチルエーテル、ジ-n-ブチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル、酢酸エチル、酢酸ブチルなど）を反応混合物に添加できる。内容物をオービタルシェーカー上で活発に混合又は震盪することができる。

好ましい実施態様では、反応は、カルボニル化合物を全細胞生物触媒とジ-n-ブチルエーテルを含む30のリン酸緩衝液（pH6.5）中で接触させることによって実施される。

【0044】

具体的な実施態様では、本発明は、工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で製造するための製造方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：

(i) エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、及び

40

50

(iii) 前記エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートを、細胞の表面でCRSポリペプチドを発現する大腸菌株BL21(DE3)、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)、グルコースデヒドロゲナーゼ及び緩衝溶液と接触させて、エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートをエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに変換するための反応混合物を形成する工程。場合によって、有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を前記反応混合物に添加することができる。

なお別の具体的な実施態様では、本発明は、工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰及び高収量で、エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートのデザイナー全細胞生物触媒還元を介して製造する製造方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：

(i) エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、及び
(ii) 前記エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートを、細胞の表面でCRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを同時に発現する大腸菌株BL21(DE3)、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び緩衝溶液と接触させて、エチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートをエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに変換するための反応混合物を形成する工程。場合によって、有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を前記反応混合物に添加することができる。

【0045】

好ましい実施態様では、補因子としてニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NAPDH)を用いる、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換速度は、CRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現する大腸菌株BL21(DE3)を、CRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現する大腸菌株C41(DE3)で取り替えると1.3倍高い。

好ましい実施態様では、補因子としてニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NAPDH)を用いる、エチル-4-クロロ-3-オキソブチレートからエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換速度は、CRSポリペプチドのみを細胞の表面で発現し補因子リサイクリング用外部GDHの添加を要求する大腸菌株BL21(DE3)と比較して、CRSポリペプチド及びGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現する大腸菌株C41(DE3)で約1.6倍高い。

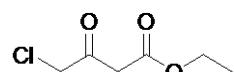
具体的な実施態様では、本発明は、工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で、高い生産性及び少なくとも150g l⁻¹の生成物蓄積で製造する製造方法を提供する。

【0046】

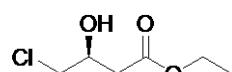
したがって、本発明の主要な実施態様はデザイナー細胞を提供し、前記デザイナー細胞は、配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、下記式1のエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性を有する：

【0047】

【化6】



式 1



式 2

【0048】

10

20

30

40

50

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、式1のエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり約275倍高い活性を有する。

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、式1のエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して単位細胞質量当たり15倍から26倍高い活性を有する。
10

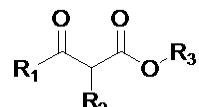
【0049】

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、式1のエチル-4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して単位細胞質量当たり少なくとも15倍高い活性を有する。

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、下記式3の化合物の還元のために配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から275倍高い活性を有する：
20

【0050】

【化7】



式 3

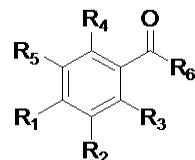
【0051】

式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、下記式4の化合物の還元のために配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から180倍高い活性を有する：
40

【0052】

【化8】



式 4

【0053】

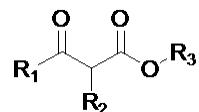
式中、 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{R}_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $\text{R}_6 = \text{アル$ 50

キル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して単位細胞質量当たり約3倍から15倍高い活性を有する：

【0054】

【化9】



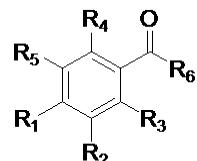
10

式 3

式中、 $R_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $R_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $X = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ であって；

【0055】

【化10】



20

式 4

【0056】

式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。

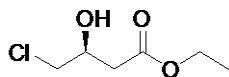
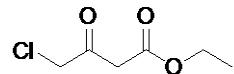
【0057】

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり200倍から250倍強化された活性を有する：

30

【0058】

【化11】



40

式 1

式 2

【0059】

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4

50

-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり約270倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり約225倍強化された活性を有する。

【0060】

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約11倍から24倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量当たり9倍から31倍強化された活性を有する。10

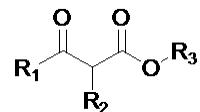
本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約24倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量当たり約31倍強化された活性を有する。20

【0061】

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、下記式3の化合物の還元のために配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約55倍から270倍高い活性を有する：

【0062】

【化12】



式3

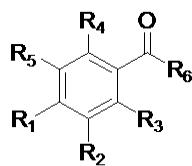
【0063】

式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、下記式4の化合物の還元のために配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較してCRSポリペプチドの単位質量当たり約40倍から156倍高い活性を有する：40

【0064】

【化13】



式4

【0065】

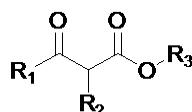
式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。

10

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、前記細胞は、配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応する対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して単位細胞質量当たり約3倍から24倍高い活性を有する：

【0066】

【化14】



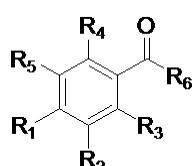
20

式3

式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8であって；

【0067】

【化15】



式4

【0068】

式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。

30

【0069】

本発明の別の実施態様は本発明に記載するデザイナー細胞を提供し、ここで、前記デザイナー細胞は組換え大腸菌BL21(DE3)又は組換え大腸菌C41(DE3)又は組換え大腸菌C43(DE3)である。

40

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有しカルボニルレダクターゼ活性を示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有しカルボニルレダクターゼ活性を示すポリペプチド、及び配列番号:9又は11のアミノ酸配列を有しGDH活性を示すポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクターを提供する。

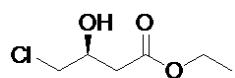
本発明のなお別の実施態様は、下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約100%鏡像体過剰の製造における、本発明に記載するデザイナー細胞の使用を提供す

50

る：

【0070】

【化16】



式 2

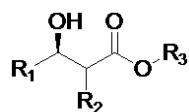
【0071】

本発明のなお別の実施態様は、式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約 10
100% 鏡像体過剰の製造における、請求項8に記載のデザイナー細胞の使用を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、下記式5の化合物の製造における、本発明に記載するデ
ザイナー細胞の使用を提供する：

【0072】

【化17】



式 5

20

【0073】

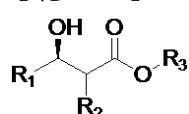
式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであ
り、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であ
り、さらにm = 1 - 8である。

【0074】

本発明のなお別の実施態様は、下記式5の化合物の製造における、本発明に記載するデ
ザイナー細胞の使用を提供する：

【0075】

【化18】



式 5

30

【0076】

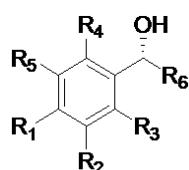
式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであ
り、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であ
り、さらにm = 1 - 8である。

本発明のなお別の実施態様は、下記式6の化合物の製造における、本発明に記載するデ
ザイナー細胞の使用を提供する：

40

【0077】

【化19】



式 6

【0078】

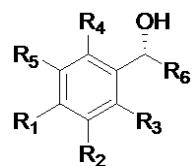
式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アル
50

キル基、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n=1$ から5である。

本発明のなお別の実施態様は、下記式6の化合物の製造における、本発明に記載するデザイナー細胞の使用を提供する：

【0079】

【化20】



式 6

10

【0080】

式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、F、Cl、Br、I、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $R_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n=1$ から5である。

【0081】

本発明の別の実施態様は、アクセッショング番号MTCC No.5806、MTCC No.5807、MTCC No.5808及びMTCC No.5809を有するデザイナー細胞を提供し、ここで、前記デザイナー細胞は配列番号:2、4、6及び8を有するスクレオチド配列を含み、配列番号:2、4、6及び8を有する前記スクレオチド配列は配列番号:1、3、5及び7を有するアミノ酸配列を発現することができる。

20

本発明の別の実施態様は、アクセッショング番号MTCC No.5810、MTCC No.5811、MTCC No.5812、MTCC No.5813、MTCC No.5814、MTCC No.5815、MTCC No.5816及びMTCC No.5817を有するデザイナー細胞を提供し、ここで、MTCC No.5810は配列番号:2及び配列番号:10を有するスクレオチド配列を含み、MTCC No.5811のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:2及び配列番号:12を有するスクレオチド配列を含み、MTCC No.5812のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:4及び配列番号:10を有するスクレオチド配列を含み、MTCC No.5813のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:4及び配列番号:12を有するスクレオチド配列を含み、MTCC No.5814のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:6及び配列番号:10を有するスクレオチドを含み、MTCC No.5815のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:6及び配列番号:12を有するスクレオチド配列を含み、MTCC No.5816のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:8及び配列番号:10を有するスクレオチド配列を含み、MTCC No.5817のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:8及び配列番号:12を有するスクレオチド配列を含み、さらに、MTCC No.5810のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:1及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5811のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:1及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5812のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:3及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5813のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:3及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5814のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:5及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5815のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:5及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5816のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:7及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現でき、MTCC No.5817のアクセッショング番号を有するデザイナー細胞は配列番号:7及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現できる。

30

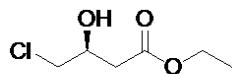
【0082】

本発明の別の実施態様は、下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で製造するプロセスを提供し：

【0083】

40

【化21】



式2

【0084】

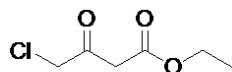
前記プロセスは以下の工程を含む：

a. 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程：

【0085】

10

【化22】



式1

【0086】

b. 前記エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、本発明1に記載するデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させる工程；

20

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程；

d. 前記反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程；

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて前記生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程。

【0087】

本発明の別の実施態様は、pHが好ましくは6.5である、本発明に記載するプロセスを提供する。

30

本発明の別の実施態様は、温度が好ましくは30 である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、有機溶媒が好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、デザイナー細胞が好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、本発明に記載するプロセスを提供する。

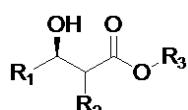
【0088】

40

本発明の別の実施態様は、本発明に記載する下記式5の光学的に濃縮された脂肪族アルコールを製造するプロセスを提供し：

【0089】

【化23】



式5

【0090】

50

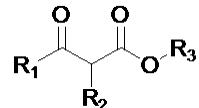
(式中、 $R_1 = CH_3$ 、 CH_2X 、 $(CH_3)_2CH$ 、 CF_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_2 = H$ 、 X 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_m$ であり、 $X = Cl$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である)、

前記プロセスは以下の工程を含む：

a. 下記式3のケトンを提供する工程：

【0091】

【化24】



10

式 3

【0092】

(式中、 $R_1 = CH_3$ 、 CH_2X 、 $(CH_3)_2CH$ 、 CF_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_2 = H$ 、 X 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $R_3 =$ アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_m$ であり、 $X = Cl$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である)；

b. 工程(a)で提供される式3のケトンを、本発明に記載するデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程；

20

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程；

d. 前記反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程；

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程。

【0093】

本発明の別の実施態様は、pHが好ましくは6.5である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、温度が好ましくは30である、本発明に記載するプロセスを提供する。

30

本発明の別の実施態様は、有機溶媒が好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、デザイナー細胞が好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、本発明に記載するプロセスを提供する。

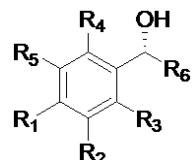
【0094】

本発明の別の実施態様は、本発明に記載する下記式6の光学的に濃縮されたアリールアルコールを製造するプロセスを提供し：

40

【0095】

【化25】



式 6

【0096】

50

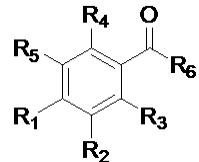
(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である)、

前記プロセスは以下の工程を含む：

a. 下記式4のケトンを提供する工程：

【0097】

【化26】



10

式 4

【0098】

(式中、 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = H$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 R_6 = アルキル基、例えば CH_3 又は $CH_3(CH_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である)；

b. 工程(a)で提供される式3のケトンを、本発明に記載するデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程；

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程；

d. 前記反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程；

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式6の化合物を単離する工程。

【0099】

本発明の別の実施態様は、pHが好ましくは6.5である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、温度が好ましくは30 である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、有機溶媒が好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、本発明に記載するプロセスを提供する。

本発明の別の実施態様は、デザイナー細胞が好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、本発明に記載するプロセスを提供する。

【0100】

本発明の別の実施態様は、アクセッション番号MTCC No.5806、MTCC No.5807、MTCC No.5808及びMTCC No.5809を有するデザイナー細胞を提供する。

本発明のなお別の実施態様はデザイナー細胞を提供し、前記デザイナー細胞は、アクセッション番号MTCC No.5806 - 5807を有し、配列番号:1、3、5及び7を有するアミノ酸配列を発現する。

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1、3、5、7を有するアミノ酸配列が配列番号:2、4、6及び8を有するヌクレオチド配列に一致する、本発明に記載するデザイナー細胞を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1 - 8がカルボニルレダクターゼの天然に存在しない配列であるデザイナー細胞を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、高活性のカルボニルレダクターゼを細胞表面で発現することができるデザイナー細胞を提供する。

20

30

40

50

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1 - 8を含み、さらに前記を発現することができる組換えベクター構築物を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、カルボニルレダクターゼ酵素の天然に存在しない配列を含む組換えベクター構築物を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、高活性のカルボニルレダクターゼを細胞表面で発現することができる、本発明に記載する組換えベクター構築物を提供する。

【0101】

本発明のなお別の実施態様は、アクセッション番号MTCC No.5810、MTCC No.5811、MTCC No.5812、MTCC No.5813、MTCC No.5814、MTCC No.5815、MTCC No.5816及びMTCC No.5817を有するデザイナー細胞を提供する。 10

本発明のなお別の実施態様は以下のようなデザイナー細胞を提供する：MTCC No.5810のアクセッション番号を有し配列番号:1及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5811のアクセッション番号を有し配列番号:1及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5812のアクセッション番号を有し配列番号:3及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5813のアクセッション番号を有し配列番号:配列番号:3及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5814のアクセッション番号を有し配列番号:5及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5815のアクセッション番号を有し配列番号:5及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5816のアクセッション番号を有し配列番号:7及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞；MTCC No.5817のアクセッション番号を有し配列番号:7及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現するデザイナー細胞。 20

【0102】

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1、3、5、7、9及び11を有するアミノ酸配列が配列番号:2、4、6、8、10及び12を有するヌクレオチド配列に一致する、デザイナー細胞を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを細胞の表面で一緒に同時発現することができるデザイナー細胞を提供する。

本発明のなお別の実施態様は、配列番号:1、3、5、7、9及び11を有するアミノ酸配列並びに配列番号:2、4、6、8、10及び12を有するヌクレオチド配列を含み、さらに前記を発現することができる組換えベクターを提供する。 30

本発明の別の実施態様は、酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる、本発明に記載する組換えベクター構築物を提供する。

本発明の別の実施態様は、本発明の例えはここに記載するように式5又は式6又は式2の化合物を製造する方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：(a) 本発明の例えはここに記載するように式3を有するケトンを提供する工程；(b) 工程(a)の式3のケトンを、配列番号:1 - 12を単独で又は本発明の例えはここに記載するように組み合わせて含む本発明の例えはここに記載するデザイナー細胞、並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)、場合によって必要ならば100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程；(c) 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えは酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程；(d) 前記反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、及び工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5又は式6又は式2の化合物を単離する工程。 40

【0103】

本発明の利点

1. 本発明は全細胞生物触媒を提供し、前記生物触媒は、エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを工業的に重要なエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに変換する従来技 50

術の生物触媒と比較して、CRSの単位質量当たり少なくとも250倍改善された変換速度を有する。

2. 本発明は全細胞生物触媒を提供し、前記生物触媒は、同じ細胞の表面にレダクターゼ及び補酵素再生活性の両方が存在するが故に補因子ローディングに対しより高い効率を有する。そのような系では、補因子ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH) / ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)は、細胞の表面で非常に近接して配置されるCRSとGDH酵素との間を水路で運ばれる。

3. 鏡像体的に濃縮されたアルコールが顕著に高い変換速度で製造される。より具体的には、エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートは、顕著に高い変換速度で少なくとも 150g l^{-1} の生成物蓄積とともに約100%の鏡像体過剰で生成される(前記は、ヒドロキシメチルグルタルリル-CoA(HMG-CoA)レダクターゼ阻害剤の製造のためにキラル構築プロック及び中間体として有用である)。

【0104】

プラスミド及び形質転換体

本発明の発現プラスミドはpET23(a)-omp-CRSを含み、前記は配列番号:1又は3又は5又は7によって表されるアミノ酸配列を有するポリペプチド(カルボニルレダクターゼ活性を示す)をコードする、配列リストの配列番号:2又は4又は6又は8によって表されるDNA配列を有する。

本発明の発現プラスミドはpETDuet1-omp-CRS; omp-GDHを含み、前記は、配列番号:1又は3又は5又は7によって表されるアミノ酸配列を有するCRSポリペプチド(カルボニルレダクターゼ活性を示す)をコードする配列番号:2又は4又は6又は8によって表されるDNA配列、及び配列番号:9又は11によって表されるアミノ酸配列を有するGDHポリペプチド(GDH活性を示す)をコードする配列番号:10又は12によって表されるDNA配列を有する。

本発明のDNAを含むプラスミドは化学的にコンピtentな宿主細胞に公知の方法によって導入できる。大腸菌DH5 α をクローニング宿主として、さらに大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)及び大腸菌C43(DE3)を発現宿主として用いた。

本発明の形質転換体の例として、大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSを記載することができる。

より具体的には、本発明の形質転換体の例として、大腸菌C41(DE3)+pET23(a)-omp-CRSを記載することができる。

【0105】

カルボニルレダクターゼ活性を有する形質転換体

カルボニルレダクターゼ活性を有する形質転換体が、基質(エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを含む)のカルボニル基及び補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)と反応すると、前記はカルボニル基を有する化合物(エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを含む)を不整還元して、光学的に純粋な対応するアルコール(エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを含む)を生成する。発現プラスミドpET23(a)-omp-CRS及びpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを有する上記に記載する本発明の形質転換体はカルボニルレダクターゼ活性を有する。より正確には、発現プラスミドpET23(a)-omp-CRS及びpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを有する上記に記載する本発明の形質転換体は、カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドを細胞の表面で発現した。

【0106】

カルボニルレダクターゼ及び補酵素再生活性の両方を有する形質転換体

CRS及びGDH発現プラスミドを一緒に含む(すなわちpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを含む)、上記に記載する本発明の形質転換体は、カルボニルレダクターゼ及び補酵素再生活性の両方を示す。より正確には、発現プラスミドpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを有する上記に記載する本発明の形質転換体は、カルボニルレダクターゼ及び補酵素再生活性の両方を有するポリペプチドを細胞の表面で発現した。

【0107】

株の呼称及び寄託の詳細

10

20

30

40

50

“ CRSポリペプチド ” 及び “ GDHポリペプチド ” を発現する合成した組換え大腸菌株を下記の国際寄託機関に寄託した：International Depository Authority, Microbial Type Culture Collection and Gene Bank (MTCC), Institute of Microbial Technology, Sector 39A, Chandigarh 160036, India。前記株の呼称及び割り当てられたアクセション番号は以下に提供する。株MTCC 5806、5807、5808及び5809は“ CRSポリペプチド ” 配列番号:1、3、5及び7をそれぞれ発現する。株MTCC 5810から5817は“ CRSポリペプチド ” (配列番号:1、3、5及び7) 及び “ GDHポリペプチド ” (配列番号:9及び11) を共同発現する。説明中でアミノ酸配列には奇数が割り当てられている。個々のアミノ酸をコードするヌクレオチド配列は直ぐ次の偶数が割り当てられている。例えば、配列番号:1のアミノ酸については、対応するコードヌクレオチド配列には配列番号:2が割り当てられている。

10

【 0 1 0 8 】

| 配列番号 | 株 | MTCC No. |
|------|---|-----------|
| 1 | 大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (配列番号:2) | MTCC 5806 |
| 2 | 大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (配列番号:4) | MTCC 5807 |
| 3 | 大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (配列番号:6) | MTCC 5808 |
| 4 | 大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (配列番号:8) | MTCC 5809 |
| 5 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:2+10) | MTCC 5810 |
| 6 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:2+12) | MTCC 5811 |
| 7 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:4+10) | MTCC 5812 |
| 8 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:4+12) | MTCC 5813 |
| 9 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:6+10) | MTCC 5814 |
| 10 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:6+12) | MTCC 5815 |
| 11 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:8+10) | MTCC 5816 |
| 12 | 大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (配列番号:8+12) | MTCC 5817 |

20

【 0 1 0 9 】

大腸菌表面でのCRS発現の提示

CRSを発現する組換え細胞を溶解させ、遠心分離によって細胞屑を除去し、続いて膜分画及び可溶性分画の分離のために上清を4度1,000,000gにて2時間超遠心分離に付した。膜分画を含む沈降物を緩衝液で洗浄し、膜可溶化緩衝液 (25 mMトリスHCl、20%グリセロース及び2%トリトンX100 (pH7.5)) に再懸濁させた。3つの分画全て (無細胞抽出物、膜分画及び可溶性タンパク質分画) の活性を基質としてエチル4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを用いてアッセイした。活性の大半は膜分画から回収された。

30

大腸菌細胞の表面におけるCRSの存在は、大腸菌の超薄切片で実施したEM免疫金標識試験によってさらにまた確認された。抗CRSポリクローナル抗体は精製CRSに対してウサギで作製し、それらの特異性についてはウェスタンプロットティングによってアッセイした。精製CRSを還元条件下でSDS-PAGE上で泳動し、ニトロセルロース膜へ電気的にプロットティングした後でウサギ抗CRSポリクローナル抗体を用いてプローブし、前記をさらにアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG (全分子) 二次抗体でプローブした。続いて、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP, 0.15mg/mL) 、ニトロブルーテトラゾリウム (NBT, 0.30mg/mL) 、トリスHCl (100mM) 及びMgCl₂ (5mM) (pH9.5) を含む基質溶液に前記を10分間浸漬することによってプロットをデベロップさせた。純粋なCRSを特異的に標識するポリクローナル抗体はまたomp-CRSを特異的に標識することができた。

40

数回の脱水工程の後で、大腸菌細胞をLR白色樹脂に包埋し、続いて前記を固定液として0.2%グルタルアルデヒドを用い数工程で脱水した。ウルトラミクロトームを用いて切り出した薄い切片を、ウサギ抗CRSポリクローナル抗体、続いてナノゴールド標識ヤギ抗ウサギIgG (全分子) 二次抗体とともにインキュベートし、透過型電子顕微鏡下で可視化した。種々の視野を観察し、金粒子は細胞の表面に重点的に存在することが見出された (図

50

7)。陰性コントロールとしての細胞では標識は生じなかった。

【0110】

形質転換体の使用

カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む本発明の形質転換体を用いるとき、光学的に純粋なアルコールを製造することができる。さらにまた、カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドを発現する発現プラスミドpET23(a)-omp-CRSを有する形質転換体が用いられるならば、光学的に純粂なアルコールを製造することができる。カルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生活性を有するポリペプチドを発現する発現ベクターpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを有する形質転換体が用いられるとき、光学的に純粂なアルコールを製造することができる。特に、カルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生活性を有するポリペプチドを発現する発現ベクターpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを有する形質転換体が用いられるとき、光学的に活性なアルコールはより効率的に製造され得る。10

本発明のカルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA及び補酵素再生能力を有するポリペプチドをコードするDNAの両方を含む形質転換体は、本発明のカルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA及び補酵素再生能力を有するポリペプチドをコードするDNAの両方を単一ベクターに導入することによって入手できる。

カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA及び補酵素再生能力を有するポリペプチドをコードするDNAの両方が導入されたベクターの例として、pETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを記載することができる。20

さらにまた、カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA及び補酵素再生能力を有するポリペプチドをコードするDNAの両方を含む形質転換体の例として、大腸菌BL21(DE3)を該当ベクターで形質転換することによって入手される大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを記載することができる。

さらにまた、カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA及び補酵素再生能力を有するポリペプチドをコードするDNAの両方を含む形質転換体の例として、大腸菌C43(DE3)を該当ベクターで形質転換することによって入手される大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを記載することができる。

カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNAを含む形質転換体、並びにカルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドをコードするDNA及び補酵素再生能力を有するポリペプチドをコードするDNAの両方を含む形質転換体の培養は、一般的に用いられている、炭素原、窒素原、無機塩及び有機栄養物などを含有する液体栄養培地で（前記転換体が増殖するかぎり）実施することができる。30

【0111】

酵素活性のアッセイ方法

カルボニルレダクターゼ活性を有するポリペプチドを発現する形質転換体の活性は通常の方法で測定できる。例えば、カルボニルレダクターゼの活性は、50mMのリン酸緩衝液（pH6.5）中の1mLの反応混合物で入手できる。前記反応混合物は、2mMのECAA、0.2mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）及び5 - 20 μLの全細胞生物触媒又は5 - 10 μgの精製タンパク質又は 10^6 - 10^7 の全細胞生物触媒を含み、反応は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）の酸化について分光光度計によつて15から60分間340nm（分子吸収係数 $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）でモニターされた。40

補酵素再生活性を有するポリペプチドを発現する形質転換体の活性は通常の方法で測定できる。例えば、グルコースデヒドロゲナーゼの活性は、100mMのトリスHCl緩衝液（pH8.0）中の1mLの反応混合物で入手できる。前記反応混合物は、10mMグルコース、0.5mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）及び5 - 20 μLの全細胞生物触媒又は5 - 10 μgの精製タンパク質又は 10^6 - 10^7 の全細胞生物触媒を含み、反応は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）の還元について分光光度計によつて15から60分間340nm（分子吸収係数 $6.22\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ）でモニターされた。50

【0112】

光学的に活性なアルコールの製造

カルボニルレダクターゼ活性を有する形質転換体及び市場で入手できるグルコースデヒドロゲナーゼ、又はカルボニルレダクターゼ活性及び補酵素再生活性の両方を有する形質転換体のどちらかを用いる光学的に活性なアルコールの製造は、基質として適切なカルボニル基を含む化合物（エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを含む）、補酵素ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADP）及びグルコースを適切な溶媒に添加し、pHを調節しつつ該混合物を攪拌することによって実施できる。

反応は、水性溶媒又は水性溶媒と有機溶媒の混合物中で実施できる。有機溶媒の例には、酢酸n-ブチル、酢酸エチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル、ジ-n-ブチルエーテルなどが含まれる。好ましくは、反応は30℃で実施でき、反応溶液のpHは、5NのNaOHで6.5に維持される。

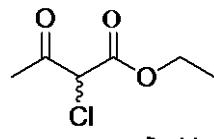
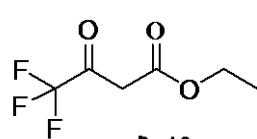
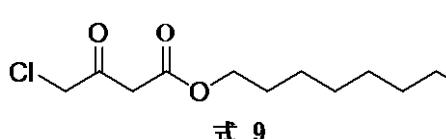
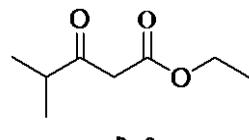
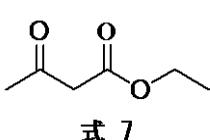
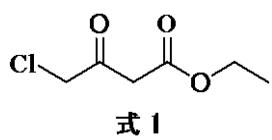
【0113】

基質及び生成物

基質として適切なカルボニル基を有する脂肪族化合物の例には、下記式1で表されるエチル4-クロロ-3-オキソブチレート、下記式7で表されるエチル-3-オキソブタノエート、下記式8で表されるエチル4-メチル-3-オキソペンタノエート、下記式9で表されるオクチル4-クロロ-3-オキソブタノエート、下記式10で表されるエチル4,4,4-トリフルオロ-3-オキソブタノエート、及び下記式11で表されるエチル2-クロロ-3-オキソブチレートが含まれる：

【0114】

【化27】



【0115】

基質として適切なカルボニル基を有する芳香族化合物の例には、下記の式12で表されるアセトフェノン、式13で表される1-(4-フルオロフェニル)エタノン、式14で表される1-(4-クロロフェニル)エタノン、式15で表される1-(4-ブロモフェニル)エタノン、式16で表される1-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)エタノン、式17で表される1-p-トリルエタノン、式18で表される1-(4-メトキシフェニル)エタノン及び式19で表されるインドリン-2,3-ジオンが含まれる：

【0116】

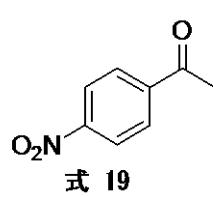
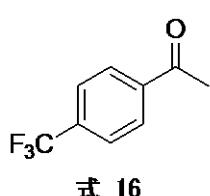
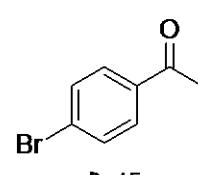
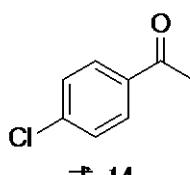
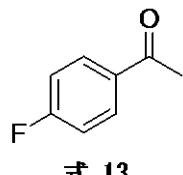
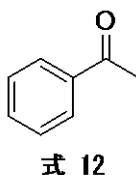
10

20

30

40

【化28】



【0117】

上述の反応条件下で、基質として上記式1で表されるエチル4-クロロ-3-オキソブチレートが用いられるとき、下記式2で表されるエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを入手できる。

基質として上記式7で表されるエチル-3-オキソブタノエートが用いられるとき、下記式20で表されるエチル(R)-3-ヒドロキシブタノエートを入手できる。

基質として上記式8で表されるエチル4-メチル-3-オキソペンタノエートが用いられるとき、下記式21で表されるエチル(S)-3-ヒドロキシ-4-メチルペンタノエートを入手できる。

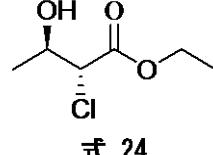
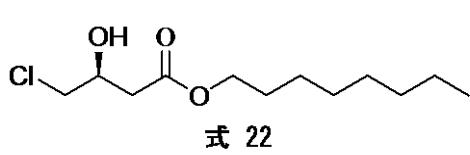
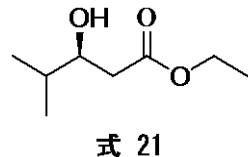
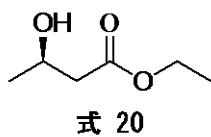
基質として上記式9で表されるオクチル4-クロロ-3-オキソブタノエートが用いられるとき、下記式22で表されるオクチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタノエートを入手できる。

基質として上記式10で表されるエチル4,4,4-トリフルオロ-3-オキソブタノエートが用いられるとき、下記式23で表されるオクチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブタノエートを入手できる。

基質として上記式11で表されるエチル2-クロロ-3-オキソブタノエートが用いられるとき、下記式24で表される(2R,3R)-エチル2-クロロ-3-ヒドロキシブタノエートを入手できる。

【0118】

【化29】



【0119】

基質として上記式12で表されるアセトフェノンが用いられるとき、下記式25で表される(R)-1-フェニルエタノールを入手できる。

基質として上記式13で表される1-(4-フルオロフェニル)エタノンが用いられるとき、下

10

20

30

40

50

記式26で表される(R)-1-(4-フルオロフェニル)エタノールを入手できる。

基質として上記式14で表される1-(4-クロロフェニル)エタノンが用いられるとき、下記式27で表される(R)-1-(4-クロロフェニル)エタノールを入手できる。

基質として上記式15で表される1-(4-ブロモフェニル)エタノンが用いられるとき、下記式28で表される(R)-1-(4-ブロモフェニル)エタノールを入手できる。

基質として上記式16で表される1-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)エタノンが用いられるとき、下記式29で表される(R)-1-(4-(トリフルオロメチル)フェニル)エタノールを入手できる。

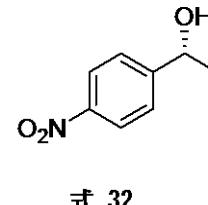
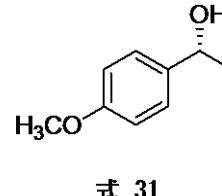
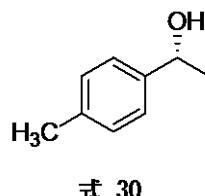
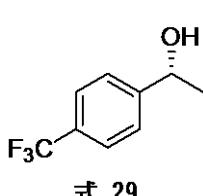
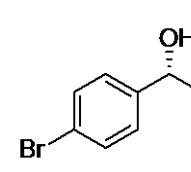
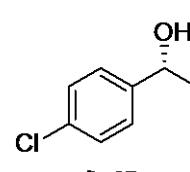
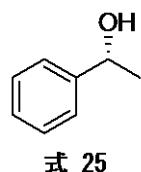
基質として上記式17で表される1-p-トリルエタノンが用いられるとき、下記式30で表される(R)-1-p-トリルエタノールを入手できる。 10

基質として上記式18で表される1-(4-メトキシフェニル)エタノンが用いられるとき、下記式31で表される(R)-1-(4-メトキシフェニル)エタノールを入手できる。

基質として上記式9で表される1-(4-ニトロフェニル)エタノンが用いられるとき、下記式32で表される(R)-1-(4-ニトロフェニル)エタノールを入手できる。

【0120】

【化30】



【0121】

精製及び分析

前記反応によって製造される光学的に純粋なアルコールは、通常の方法、例えば前記方法によって生成された光学的に純粋なアルコールを含む反応混合物を有機溶媒の酢酸エチルで抽出し、減圧下で蒸留して有機溶媒を除去し、生成混合物を蒸留、再結晶化又はクロマトグラフィープロセスに付すことによって精製することができる。

生成物の光学的純粋性は、ダイセル化学工業(Daicel Chemical Industries)の製品のキラセル(Chiracel)OB-H、キラセルOD-H、キラセルOJを用い高速液体クロマトグラフィーによって測定した。

全ての化合物の構造をNMRで確認した。NMRは溶媒として CDCl_3 、 CD_3OD 又は CD_3SOCD_3 を用いて実施した。化学的シフトは内部標準として用いたTMSからのダウンフィールドとして報告される。カップリング定数Jの値はHzで報告される。 40

【0122】

分析データ

ケトンの生物触媒還元から得られたアルコールは、シリカゲル上のフラッシュクロマトグラフィーによって精製された。

式2の化合物： $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)：1.28 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); 2.63 (3H, m); 3.61 (2H, dd, $J = 7.2$, 5.4 Hz); 4.18 (2H, q, $J = 7.2$ Hz); 4.23 (1H, m).HPLC: キラセルOB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール 96:4, 1 mL/分. 保持時間 13.2分(R)及び 14.3 分(S). []_D²⁵ = -22.1 ($c = 8.72$, CHCl_3)。

式20の化合物： $^1\text{H NMR}$ (300 MHz, CDCl_3)：1.21 (3H, d, $J = 6.5$ Hz); 1.26 (3H, t, $J = 6.8$ Hz); 2.46 (2H, m); 3.00 (1H, bs); 4.16 (3H, m).HPLC: キラセルOB-H, 217

10

20

30

40

50

, ヘキサン:イソプロパノール 96:4, 1 mL/分 . 保持時間 9.4 分(S)及び10.5分 (R). []_D²⁵ = -44.2 (c = 2.03, CHCl₃)。

式21の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.90 and 0.93 (各3H, 各t, J = 6.8 Hz); 1.26 (3H, t, J = 7.2 Hz); 1.69 (1H, m); 2.38 (1H, dd, J = 9.6, 16.5 Hz); 2.52 (1H, dd, J = 2.8, 16.5 Hz); 2.94 (1H, bs); 3.75 (1H, m,); 4.14 (2H, q, J = 7.2 Hz). HPLC: キラセルOD-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール95:5, 1 mL/分 . 保持時間 5.3 分(S) 及び7.7分(R). []_D²⁵ = -40.8 (c = 2.56, CHCl₃)。

式22の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 0.86 (3H, t, J = 6.9 Hz, H2 CH3); 1.27 (10H, m, 5 x CH₂); 1.61 (2H, m); 2.62 (2H, m); 3.60 (2H, m); 4.11 (2H, t, J = 6.8 Hz); 4.14 (1H, m, H3). HPLC: キラセルOB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール 96:4, 1 mL/分 . 保持時間 5.7分(R) 及び7.6 分(S). []_D²⁵ = -15.9 (c = 4.60, CHCl₃). 10

式23の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.29 (3H, t, J = 7.2 Hz); 2.70 (2H, m); 4.21 (2H, q, J = 7.2 Hz); 4.43 (1H, m). []_D²⁵ = -20.3 (c = 1.87, CHCl₃)。

式24の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.34 (m, 6H); 4.25 (m, 4H). de = >96% b y GC: FactorfourTM (Varian, 30m x 0.25mm, 140 , N₂ 1 kg/分), 保持時間9.98 (syn), 8.85 (anti); >99% anti. Ee.>98% GC betaDexTM (Supelco, 30m x 0.25mm, 140 , N₂ 1 kg/分), 文献による旋光性の比較に基づいて一時的に割り当てた (2R, 3R) 立体配置 []_D²⁵ = -3.8 (c = 1.13, CHCl₃)。

式25の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.49 (3H, d, J = 6.5 Hz); 2.10 (1H, bs); 4.87 (1H, q, J = 6.5 Hz); 7.35 (5H, m). HPLC: キラセル OB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール 96:4, 1 mL/分 . 保持時間6.2分(R) 及び9.2分(S). []_D²⁵ = +54.8 (c = 2.74, CHCl₃). 20

式26の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.49 (3H, d, J = 6.5 Hz); 2.03 (1H, bs); 4.89 (1H, q, J = 6.5 Hz); 7.01 and 7.03 (各2H, 各 d, J = 8.6 Hz). HPLC: キラセルOB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール96:4, 1 mL/分 . 保持時間7.8分 (S) 及び8.8 分(R). []_D²⁵ = +48.8 (c = 1.4, CHCl₃)。

式27の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.47 (3H, d, J = 6.5 Hz); 2.1 (1H, bs, OH); 4.87 (1H, q, J = 6.5 Hz); 7.31 (4H, s). HPLC: キラセルOB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール96:4, 1 mL/分 . 保持時間8.9分(S) 及び10.5分(R). []_D²⁵ = +49.2 (c = 1.83, エーテル). 30

式28の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.47 (3H, d, J = 6.5 Hz); 2.08 (1H, bs); 4.87 (1H, q, J = 6.5 Hz); 7.25及び7.47 (各2H, 各, J = 8.7 Hz). HPLC: キラセルOB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール96:4, 1 mL/分 . 保持時間9.4分(S) 及び11.4分 (R). []_D²⁵ = +38.3 (c = 1.55, CHCl₃).

式29の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.5 (3H, d, J = 6.51 Hz); 2.33 (1H, bs); 4.98 (1H, q, J = 6.5 Hz); 7.48及び7.60 (各2H, 各d, J = 8.2 Hz). []_D²⁵ = +27.2 (c 2.08, MeOH).

式30の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.48 (3H, d, J = 6.5 Hz); 2.01 (1H, bs); 2.38 (1H, s); 4.87 (1H, q, J = 6.5 Hz); 7.15及び7.26 (各2H, 各d, J = 7.9 Hz). H PLC: キラセル OB-H, 217, ヘキサン:イソプロパノール95:5, 1 mL/分 . 保持時間10.1分(S) 及び12.9分(R). []_D²⁵ = +52.1 (c = 1.98, CHCl₃). 40

式31の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.46 (3H, d, J = 6.5 Hz); 2.08 (1H, bs); 3.80 (3H, s); 4.84 (1H, q, J = 6.5 Hz); 6.86及び7.28 (各2H, 各d, J = 8.2). []_D²² = +51.4 (c 1.72, CHCl₃).

式32の化合物 : ¹H NMR (300 MHz, CDCl₃): 1.52 (3H, t, J = 6.5 Hz, CH₃); 2.50 (1H, bs, OH); 5.02 (1H, q, J = 6.5 Hz, CH); 7.54及び8.12 (各2H, 各d, J = 8.9 Hz, アリール). []_D²⁵ = +31.4 (c = 3.99, CHCl₃).

【 0 1 2 3 】

下記の記載は単に実施態様の見本であり、本発明に対しその範囲、応用性又は構成をいかなる態様でも制限することを意図せず、むしろ以下の記載は、本発明の典型的な実施態

様の実行のための便利な例示を提供し、記載した実施態様に対する種々の変更を本発明の範囲を逸脱することなく記載の成分の機能及び構成において実施することが可能である。

実施例

以下の実施例で用いられる組換えDNA技術に関する具体的な操作方法は以下の文献に記載されている：Sambrook, J. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989; Vol. 2.

【実施例 1】

【0124】

大腸菌の表面でカルボニルレダクターゼを発現する発現プラスミドpET23(a)-omp-CRSの構築

10

本発明のDNAを有する人工的な注文合成プラスミドpUC19-omp-CRSは、配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列をコードする配列リストの配列番号:2のヌクレオチド配列を有する。前記プラスミドをNde1及びEcoR1で二重消化し、生成物をアガロースゲル電気泳動によって分離した。1.3KbのDNAフラグメントは配列リストの配列番号:2のヌクレオチド配列を有し、前記をゲルから切り出しキアクイックキット (Qiaquick kit (Qiagen)) を用いて精製した。プラスミドpET23(a)を別にNde1及びEcoR1で消化し、続いて自家結合を回避するためにウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化を実施した。Nde1及びEcoR1 (NEB Ltd, UK) 消化1.3Kb DNAフラグメントは配列リストの配列番号:2のヌクレオチド配列を有し、pET23(a)がT4DNAリガーゼ (NEB Ltd, UK) を用いて連結され、大腸菌DH5 α を形質転換した。生成クローンをアンピシリン (100mg/mL) 含有LBプロスで増殖させ、プラスミドを単離し、続いて前記をNde1及びEcoR1で二重消化した。二重消化後にプラスミドは3.6KbのpET23(a)骨格及び1.3KbのDNA挿入物を生じ、配列リストの配列番号:2のヌクレオチド配列がpET23(a)のlacプロモーターの下流でクローニングされ、4.9KbのプラスミドpET23(a)-omp-CRSを生じたことを示唆した。

20

プラスミドpET23(a)-omp-CRSの制限マップは図5に示されている。

大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)又は大腸菌C43(DE3)が、プラスミドpET23(a)-omp-CRSで形質転換された（前記プラスミドは形質転換体の表面でカルボニルレダクターゼを発現する）。

【実施例 2】

【0125】

形質転換体の細胞質でカルボニルレダクターゼを発現する発現ベクターpET23(a)-CRSの構築

30

前記を米国特許2010/0028972に開示された情報を用いて構築した。クローニング用CRSF (配列番号:26) 及びCRSR (配列番号:28) ブライマーは、配列リストの配列番号:14で表されるカルボニルレダクターゼ遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて合成された（配列番号:14は配列リストの配列番号:13のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする）。注文合成pUC19-omp-CRSプラスミドを1反応30サイクルのポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) に付した。PCR条件は、95 $^{\circ}$ で5分の最初の変性、続いて以下の30サイクル (95 $^{\circ}$ で60秒、58 $^{\circ}$ で60秒及び72 $^{\circ}$ で60秒とともに72 $^{\circ}$ で5分の最後の伸長工程) であった。精製PCR生成物をNde1及びXho1で消化し、1%アガロースゲル上で泳動した。0.87KbのNde1及びXho1消化フラグメントをゲルから切り出し、キアクイックキット (Qiagen) を用いて精製した。プラスミドpET23(a)を別にNde1及びXho1で消化し、続いて自家結合を回避するためにウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化を実施した。Nde1及びXho1消化0.87Kbは配列リストの配列番号:14のヌクレオチド配列を有し、pET23(a)がT4DNAリガーゼを用いて連結され、大腸菌DH5 α を形質転換した。生成クローンをアンピシリン含有LBプロスで増殖させ、プラスミドを単離し、続いて前記をNde1及びXho1で二重消化した。二重消化後にプラスミドは3.6KbのpET23(a)骨格及び0.87Kbの挿入物を生じ、0.87Kb遺伝子はpET23(a)のlacプロモーターの下流でクローニングされ、4.4KbのプラスミドpET23(a)-CRSを生じたことを示唆した。

大腸菌BL21(DE3)がプラスミドpET23(a)-CRSで形質転換された（前記プラスミドは細胞

40

50

質でカルボニルレダクターゼを発現する)。

【実施例3】

【0126】

カルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを形質転換体の表面で共同発現する発現ベクターpETDuet1-omp-CRSの構築

発現ベクターpETDuet1-omp-CRSは2つのポリペプチドを共同発現する。前記ポリペプチドの一方は、配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列を有し、カルボニルレダクターゼ活性を示し、他方のポリペプチドは配列リストの配列番号:9のアミノ酸配列を有し形質転換体の表面で補酵素再生活性を示す。前記発現ベクターの構築という目標を達成するために、発明者らは、2つのマルチクローニングサイトを含むプラスミドpETDuet1を選択した(前記マルチクローニングサイトの各々でT7プロモーター/lacオペレーター及びリボソーム結合部位(rbs)が先行する)。omp-CRS及びomp-GDH遺伝子をpETDuet1プラスミドでクローニングした(前記は二段工程である)。

第一の工程では、本発明のDNA(配列リストの配列番号:1のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列リストの配列番号:2のヌクレオチド配列を有する)をプラスミドpUC19-omp-CRSから増幅した(前記はプライマーoc1F(配列番号:30)及びoc1R(配列番号:32)によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の鑄型として用いられた)。PCR条件は、95

で5分の最初の変性、続いて以下の30サイクル(95で60秒、55で60秒及び72で90秒とともに72で5分の最後の伸長工程)であった。精製PCR生成物をNco1及びHind3で消化し、1%アガロースゲル上で泳動した。1.3KbのNco1及びHind3消化フラグメントをゲルから切り出し、キアクイックキット(Qiagen)を用いて精製した。プラスミドpETDuetを別にNco1及びHind3で消化し、続いて自家結合を回避するためにウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化を実施した。T4DNAリガーゼを用いてNco1及びHind3消化omp-CRS及びpETDuet1を連結し、大腸菌DH5 α を形質転換した。生成クローンをアンピシリン(100 μ g/mL)含有LBプロスで増殖させ、前記からプラスミドを単離し、続いてNco1及びHind3で二重消化した。二重消化後にプラスミドは~5.4KbのpETDuet1骨格及び1.3Kbの配列番号:2の挿入物を生じ、配列番号:2はpETDuet1のlacプロモーターの下流の第一のマルチクローニングサイトでクローニングされ、6.7KbのプラスミドpETDuet1-omp-CRSを生じたことを示唆した。

第二の工程では、本発明のDNA(配列リストの配列番号:9のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする配列リストの配列番号:10のヌクレオチド配列を有する)を人工的な注文製作プラスミドpUC19-omp-GDHから増幅した(前記はプライマーogF(配列番号:34)及びogR(配列番号:36)によるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)の鑄型として用いられた)。PCR条件は、95で5分の最初の変性、続いて以下の30サイクル(95で60秒、55で60秒及び72で90秒とともに72で5分の最後の伸長工程)であった。精製PCR生成物をNde1及びXho1で消化し、アガロースゲル上で泳動した。1.2KbのNde1及びXho1消化フラグメントをゲルから切り出し、キアクイックキット(Qiagen)を用いて精製した。上記記載のように構築した6.7KbプラスミドpETDuet1-omp-CRSを別にNde1及びXho1で消化し、続いて自家結合を回避するためにウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化を実施した。T4DNAリガーゼを用いてNde1及びXho1消化配列番号:4及びpETDuet1-omp-CRSを連結し、大腸菌DH5 α を形質転換した。生成クローンをアンピシリン含有LBプロスで増殖させ、前記からプラスミドを単離し、続いてNde1及びXho1で二重消化した。二重消化後にプラスミドは~6.7KbのpETDuet1-omp-CRS骨格及び1.2Kbのomp-GDH挿入物を生じ、omp-GDHはpETDuet1-omp-CRSのlacプロモーターの下流の第二のマルチクローニングサイトでクローニングされ、7.8KbのプラスミドpETDuet1-omp-CRS,omp-GDHを生じたことを示唆した。

プラスミドpETDuet1-omp-CRS,omp-GDHの制限マップは図6に示されている。

大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)又は大腸菌C43(DE3)が、プラスミドpETDuet1-omp-CRS,omp-GDHで形質転換された(前記は形質転換体の表面でカルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを共同発現する)。

【実施例4】

10

20

30

40

50

【0127】

形質転換体の調製

実施例1で構築した組換えプラスミドpET23(a)-omp-CRSを用いて、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)及び大腸菌C43(DE3)の形質転換受容性細胞を形質転換して、表面でカルボニルレダクターゼを発現する大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS、大腸菌C41(DE3)+pET23(a)-omp-CRS及び大腸菌C43(DE3)+pET23(a)-omp-CRSを得た。

同様に、実施例3で構築した組換えプラスミドpETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを用いて、大腸菌BL21(DE3)、大腸菌C41(DE3)及び大腸菌C43(DE3)の形質転換受容性細胞を形質転換して、表面でカルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼの両方を発現する大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDH、大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDH及び大腸菌C43(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDHを得た。
10

実施例2で構築した組換えプラスミドpET23(a)-CRSを用いて、大腸菌BL21(DE3)の形質転換受容性細胞を形質転換して、細胞の細胞質でカルボニルレダクターゼを発現する大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRSを得た。

実施例2で構築した組換えプラスミドpET23(a)-CRS及び下記のように構築されるpET29(a)-GDHを用いて、大腸菌BL21(DE3)の形質転換受容性細胞を形質転換して、細胞の細胞質でカルボニルレダクターゼ及びグルコースデヒドロゲナーゼを発現する大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRS,pET29(a)-GDHを得た。大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRS,pET29(a)-gdhは、Kizakiらの文献に開示された技術を用いて構築した (Kizaki, N. et al. Applied Microbiology and Biotechnology 2001, 55, 590-595)。
20

【0128】

組換えプラスミドpET29(a)-GDHの構築：クローニング用gdhF（配列番号:38）及びgdhR（配列番号:40）プライマーを、配列リストの配列番号:26で表されるグルコースデヒドロゲナーゼ遺伝子のヌクレオチド配列に基づいて合成した（配列番号:26は配列リストの配列番号:25のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする）。注文合成pUC19-omp-gdhプラスミドを1反応30サイクルのポリメラーゼ連鎖反応（PCR）に付した。PCR条件は、95

度5分の最初の変性、続いて以下の30サイクル（95 度60秒、52 度60秒及び72 度60秒とともに72 度5分の最後の伸長工程）であった。精製PCR生成物をNde1及びXho1で消化し、1%アガロースゲル上で泳動した。0.81Kb のNde1及びXho1消化フラグメントをゲルから切り出し、キアクイックキット（Qiagen）を用いて精製した。プラスミドpET29(a)を別にNde1及びXho1で消化し、続いて自家結合を回避するためにウシ腸アルカリホスファターゼを用いて脱リン酸化を実施した。Nde1及びXho1消化0.81Kb は配列リストの配列番号:26のヌクレオチド配列を有し、pET29(a)がT4DNAリガーゼを用いて連結され、大腸菌DH5 α を形質転換した。生成クローンをカナマイシン含有LBプロスで増殖させ、プラスミドを単離し、続いて前記をNde1及びXho1で二重消化した。二重消化後にプラスミドは5.4KbのpET29(a)骨格及び0.81Kbの挿入物を生じ、0.81Kb遺伝子はpET29(a)のlacプロモーターの下流でクローニングされ、6.0KbのプラスミドpET29(a)-GDHを生じたことを示唆した。
30

【実施例5】

【0129】

形質転換体での遺伝子の発現

プラスミドを保持する組換え大腸菌の新鮮な培養を、抗生物質を含む10mLのルリアベルタニ（Luria Bertani）HiVegプロス培地（1%HiVegヒドロラーゼ、0.5%酵母抽出物、1%塩化ナトリウム（pH7.5））にて37 度増殖させ、6時間の増殖後、1mLの培養を抗生物質（アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールなど、単独又は組み合わせて）を含む100mLの新鮮なLB培地に接種し、200rpmの震盪状態下にて37 度増殖させた。600nmのODが0.5 - 0.6に達したとき、最終濃度0.2mMのIPTGで培養を誘発し、前記を200rpmの震盪状態下にて20 度さらに16時間増殖させた。

【実施例6】

【0130】

形質転換大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (CRS、配列番号:1) 表面でのカルボニル

10

20

30

40

50

レダクターゼの発現の提示

形質転換大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSを100mLの培地で上記実施例5に記載したように増殖させた。遠心分離によって細胞を単離し、50mMのリン酸緩衝液(pH7.0)で洗浄した。続いて前記細胞を5mLの溶解緩衝液(50 mM NaH₂PO₄、150 mM NaCl、1mg mL⁻¹リゾチーム(pH8.0))に4℃で30分懸濁した。続いて前記細胞懸濁物を4℃で20分超音波処理した(30秒パルスON及び30秒パルスOFF)。14,000rpmで30分遠心分離することによって細胞屑を除去した。続いて膜分画及び可溶性分画を分離するために上清(無細胞抽出物)を4℃、1,000,000gで2時間の超遠心分離に付した。膜分画を含む沈殿物を同じ緩衝液で洗浄し、膜可溶化緩衝液(25 mMトリスHCl、20%グリセロール及び2%トリトンX100(pH7.5))に再懸濁した。3つの分画全て(無細胞抽出物、膜分画及び可溶性タンパク質分画)を、エチル4-クロロ-3-オキソブチレートをエチル4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートに還元する活性についてアッセイした。例えば、50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中の標準反応混合物(1mL)(0.2mMニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)、2.0mMのECOB及び1-50 μLのサンプルを含む)を30℃でインキュベートし、全活性を決定した。結果は表1に要約されている。期待したように、活性の大半は膜分画から回収された。有意義なことに、大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)(陰性コントロール)は活性を全く欠いていた。

【0131】

表1：大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)及び大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS(CRS、配列番号:1)から得られた種々の分画のカルボニルレダクターゼ(CRS)活性

| 試験 | 大腸菌分画 | 大腸菌BL21(DE3)+pET23(a) 全活性(nmol/分) | 大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS、全活性(nmol/分) |
|----|--------|--------------------------------------|---|
| 1 | 無細胞抽出物 | 376 | 1673 |
| 2 | 可溶性分画 | 76 | 350 |
| 3 | 膜分画 | 0.0 | 1192 |

大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSの表面にCRSが存在することは、さらによく大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS細胞の超薄切片を用いて実施されるEM免疫金標識試験で確認された。抗CRSポリクローナル抗体を精製CRSに対してウサギで作製し、ウェスタンプロットによってそれら抗体の特異性についてアッセイした。精製CRSを還元条件下のSDS-PAGEで泳動し、ニトロセルロース膜への電気的プロッティングの後でウサギ抗CRSポリクローナル抗体を用いてプローブし、前記をさらにアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG(全分子)二次抗体でプローブした。続いて、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート(BCIP, 0.15mg/mL)、ニトロブルーテトラゾリウム(NBT, 0.30mg/mL)、トリスHCl(100mM)及びMgCl₂(5mM)(pH9.5)を含む基質溶液に前記を10分間浸漬することによってプロットをデベロップさせた。純粋なCRSを特異的に標識するポリクローナル抗体はまたomp-CRSを特異的に標識することができた。

数回の脱水工程の後で、組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)(陰性コントロール)及び大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSをLR白色樹脂に包埋し、続いて固定液として0.2%グルタルアルデヒドを用い数工程で脱水した。ウルトラミクロトームを用いて切り出した薄い切片を、ウサギ抗CRSポリクローナル抗体、続いてナノゴールド標識ヤギ抗ウサギIgG(全分子)二次抗体とともにインキュベートし、透過型電子顕微鏡下で可視化した。種々の視野を観察し、金粒子は細胞の表面に重点的に存在することが見出された(図7)。陰性コントロールとしての細胞では標識は生じなかった。

【実施例7】

【0132】

形質転換大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS(CRS、配列番号:1)における細胞質及び表面発現CRSの相対的発現レベル

組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRS(CRS、配列番号:1)及び大腸菌BL21(DE3)+pET23

10

20

30

40

50

(a)-omp-CRS (CRS, 配列番号:1) の新鮮培養を増殖させ、各クローンの全細胞プロテオームを調製した。種々の濃度の細胞から入手したプロテオームを還元状態下の12.5% SDS-PAGEで泳動した。ニトロセルロース膜への電気的プロッティングの後で、前記をウサギ抗CRSポリクローナル抗体によりプロープし、さらにアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ウサギIgG抗体でプロープした。抗体によるプロープ後に、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート (BCIP, 0.15mg/mL)、ニトロブルー・テトラゾリウム (NBT, 0.30mg/mL)、トリスHCl (100mM) 及びMgCl₂ (5mM) (pH9.5) を含む基質溶液に前記を10分間浸漬することによってプロットをデベロップさせた。CRSの発現は、対応するクローンのバンド強度をソフトウェア (Scion Image) によって分析して決定した。強度を採取細胞量に対してプロットし、細胞内発現及び表面発現の勾配 (dy/dx) を比較した。Omp-CRS融合タンパク質としての細胞の表面におけるCRSの発現は、細胞質で発現されるCRSと比較して17.9倍少ないことが見出された。
10

【実施例8】

【0133】

表面発現CRSは細胞質CRSと比較してエチル4-クロロ-3-オキソブチレートの還元について275倍の増加活性を示した

組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRS (CRS, 配列番号:1) 及び大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (CRS 配列番号:1) の新鮮培養を増殖させ、カルボニルレダクターゼ活性の測定に用いた。アッセイは、基質としてエチル4-クロロ-3-オキソブチレート及び補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) を用いて実施した。カルボニルレダクターゼ活性の初速は、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) の₃₄₀の吸収低下をモニターすることによって決定した。50mMリン酸緩衝液 (pH7.0) 中の標準反応混合物 (1mL) は、0.2mMニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) 、10⁶ - 10⁸の組換え大腸菌細胞、及び2.0mMのエチル(S)-4-クロロ-3-オキソブチレートを含んでいた。活性1ユニットは、特定の条件下で1分毎に1μmolのニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) の酸化を触媒する乾燥細胞の重量と定義した。表面でomp-CRSを発現する組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (CRS 配列番号:1) の活性は、156.20 × 10³nmol/分/gm乾燥細胞と決定された。対比して、細胞質でCRSを発現する組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRS (CRS, 配列番号:1) の活性は、10.16 × 10³nmol/分/gm乾燥細胞と決定された。したがって、等量の細胞では、表面提示CRSは15.4倍高い活性を示した。しかしながら、我々は、等量の細胞では組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-CRSは、組換え大腸菌BL21+pET23(a)-omp-CRSと比較して17.9倍多くのタンパク質を発現することを示した。したがって、組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSの単位タンパク質当たりの活性は、組換え大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRSよりも275倍高かった。結果は表2に要約されている。
20
30

【0134】

表2：omp-CRS融合タンパク質としてCRS (CRS配列番号:1) を表面で発現する組換え大腸菌と細胞質でCRS (CRS配列番号:1) を発現する組換え大腸菌の相対的活性

| 実験に使用したクローン | 活性(nmole/分/gm DCW*) | CRSの相対的濃度 | 活性/単位CRS | 活性増加の倍数 |
|-------------------------------|--------------------------|-----------|--------------------------|---------|
| 大腸菌BL21(DE3)+CRS-pET23(a) | 10.16 × 10 ³ | 17.9 | 0.57 × 10 ³ | 1 |
| 大腸菌BL21(DE3)+omp-CRS-pET23(a) | 156.20 × 10 ³ | 1 | 156.20 × 10 ³ | 275.19 |

*DCW = 乾燥細胞重量

#陰性コントロール大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)はいかなる活性も生じなかった。

【実施例9】

【0135】

10

20

30

40

50

種々のケトンの還元について表面発現CRSは細胞質CRSと比較して50倍から275倍増加活性を示した

アッセイは96ウェルELISAプレートで実施した。50mMリン酸緩衝液(pH7.0)中に、0.2mMニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)、2.0mMの基質、50 μg/mLの大腸菌細胞(細胞集合物の計算のために、OD₆₀₀=1の細胞懸濁物が0.25mg/mLの乾燥細胞重量と等しいとみなした)から成る反応混合物を30 ℃で基質の消費に応じて約30分から12時間インキュベートした。ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の消費は₃₄₀の吸収低下によってモニターした。結果は表3及び3に要約されている。期待したように、表面発現CRS(CRS配列番号:1)は、種々の脂肪族及び芳香族ケトンの還元において細胞内で発現されるCRS(CRS配列番号:1)よりもはるかに効率的であった。一般的に、活性の増加は、これらの条件下ではCRSタンパク質1ユニット当たり50倍から275倍の範囲であった。CRSの相対的濃度は実施例7に記載したように決定した。

【0136】

表3:omp-CRS融合タンパク質としてCRS(CRS配列番号:1)を表面で発現する組換え大腸菌と細胞質でCRS(CRS配列番号:1)を発現する組換え大腸菌の種々のケトン^aでの相対的活性

| 試験 | 基質 | 大腸菌BL21+pET23(a)-CRS (nmol/分/gmDCW*) | 大腸菌BL21+pET23(a)-omp-CRS (nmol/分/gmDCW*) | 活性/単位 DCW*の增加倍数 | 活性/単位タンパク質の增加倍数# |
|----|----------------------------|---|---|--------------------|------------------|
| 1 | エチル4-クロロ-3-オキソブチレート | 10.16x10 ³ | 156.20 x10 ³ | 15.37 | 275.19 |
| 2 | エチル2-クロロ-3-オキソブチレート | 30.06 x10 ³ | 161.48 x10 ³ | 5.37 | 96.12 |
| 3 | エチル-3-オキソブチレート | 3.60 x10 ³ | 12.01 x10 ³ | 3.34 | 59.80 |
| 4 | エチル4-メチル-3-オキソペンタノエート | 3.52 x10 ³ | 43.12 x10 ³ | 12.25 | 219.27 |
| 5 | オクチル4-クロロ-3-オキソブタノエート | 1.72 x10 ³ | 10.12 x10 ³ | 5.88 | 105.25 |
| 6 | エチル4,4,4-トリフルオロ-3-オキソブチレート | 1.94 x10 ³ | 5.54 x10 ³ | 2.86 | 51.19 |
| 8 | アセトフェノン | 1.54 x10 ³ | 5.19 x10 ³ | 3.37 | 60.3 |
| 9 | 4-クロロアセトフェノン | 3.43 x10 ³ | 12.28 x10 ³ | 3.58 | 64.09 |
| 10 | 4-プロモアセトフェノン | 3.79 x10 ³ | 18.48 x10 ³ | 4.88 | 87.28 |
| 11 | 4-フルオロアセトフェノン | 2.56 x10 ³ | 22.88 x10 ³ | 8.94 | 159.98 |
| 12 | 4-メチルアセトフェノン | 1.94 x10 ³ | 5.45 x10 ³ | 2.82 | 50.29 |
| 13 | 4-メトキシアセトフェノン | 1.06 x10 ³ | 3.60x10 ³ | 3.40 | 60.79 |
| 14 | 4-トリフルオロメチルアセトフェノン | 3.0 x10 ³ | 30.10 x10 ³ | 10.03 | 179.60 |
| 15 | 4-ニトロアセトフェノン | 6.16 x10 ³ | 49.63 x10 ³ | 8.06 | 142.22 |

10

20

30

40

^a補因子リサイクルのために外部GDHをアッセイ混合物に添加した。

*DCW = 乾燥細胞重量

#DCW1グラム当たりのCRS発現は、細胞質発現CRSと比較して表面発現CRSで17.9倍低かった（実施例7）。

【 0 1 3 7 】

表4：omp-CRS融合タンパク質及びomp-GDHタンパク質としてCRS（配列番号:1）及びGDH（配列番号:9）を表面で共同発現する組換え大腸菌と細胞質でCRS（配列番号:1）及びGDH（配列番号:1）を共同発現する組換え大腸菌の種々のケトンにおける相対的活性

| 試験 | 基質 | 大腸菌C41(DE3)+ pETDuet1-CRS, GDH (nmol/分/gmDCW*) | 大腸菌C41(DE3) +pETDuet1-omp- -CRS,omp-GDH (nmol/分/gmDCW*) | 活性/単位 DCW*の 増加倍数 | 活性/単位タンパク質 の増加倍数# |
|----|----------------------------|--|--|------------------------|----------------------|
| 1 | エチル4-クロロ-3-オキソブチレート | 14.42x10 ³ | 217.36 x10 ³ | 15.08 | 269.87 |
| 2 | エチル2-クロロ-3-オキソブチレート | 37.26 x10 ³ | 165.88 x10 ³ | 4.45 | 79.69 |
| 3 | エチル-3-オキソブチレート | 4.03 x10 ³ | 12.76 x10 ³ | 3.17 | 56.74 |
| 4 | エチル4-メチル-3-オキソペンタノエート | 4.06 x10 ³ | 53.02 x10 ³ | 13.06 | 233.90 |
| 5 | オクチル4-クロロ-3-オキソブタノエート | 1.65 x10 ³ | 9.50 x10 ³ | 5.74 | 102.78 |
| 6 | エチル4,4,4-トリフルオロ-3-オキソブチレート | 1.65 x10 ³ | 5.48 x10 ³ | 3.31 | 59.33 |
| 7 | アセトフェノン | 2.53 x10 ³ | 5.79 x10 ³ | 2.29 | 41.03 |
| 8 | 4-クロロアセトフェノン | 3.26 x10 ³ | 11.07 x10 ³ | 3.40 | 60.78 |
| 9 | 4-プロモアセトフェノン | 2.44 x10 ³ | 19.54 x10 ³ | 8.0 | 143.26 |
| 10 | 4-フルオロアセトフェノン | 2.96 x10 ³ | 22.66 x10 ³ | 7.64 | 136.82 |
| 11 | 4-メチルアセトフェノン | 1.97 x10 ³ | 6.53 x10 ³ | 3.31 | 59.19 |
| 12 | 4-メトキシアセトフェノン | 1.22 x10 ³ | 3.32 x10 ³ | 2.73 | 48.81 |
| 13 | 4-トリフルオロメチルアセトフェノン | 3.37 x10 ³ | 29.37 x10 ³ | 8.71 | 155.99 |
| 14 | 4-ニトロアセトフェノン | 7.07 x10 ³ | 46.31 x10 ³ | 6.55 | 117.28 |

10

20

30

40

*DCW = 乾燥細胞重量

#DCW1グラム当たりのCRS発現は、細胞質発現CRSと比較して表面発現CRSで17.9倍低かった。

【実施例10】

【0138】

形質転換大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (CRS, 配列番号:1 ; GDH, 配列番号:9) の表面におけるグルコースデヒドロゲナーゼ発現の提示

形質転換大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDH (CRS, 配列番号:1 ; GDH, 配列番号:9) を100mLの培地で上記実施例5に記載したように増殖させた。遠心分離によって細胞を単離し、50mMのリン酸緩衝液 (pH7.0) で洗浄した。続いて前記細胞を5mLの溶解緩衝液

50

(50 mM NaH₂PO₄、150 mM NaCl、1mg mL⁻¹リゾチーム(pH8.0))に4℃で30分懸濁した。続いて前記細胞懸濁物を4℃で20分超音波処理した(30秒パルスON及び30秒パルスOFF)。14000 rpmで30分遠心分離することによって細胞屑を除去し、上清(無細胞抽出物)を更なる分析のために採取した。以前に記載したように膜分画及び可溶性分画を上清(無細胞抽出物)から分離した。3つの分画全て(無細胞抽出物、膜分画及び可溶性タンパク質分画)をグルコースからグルコネートに酸化する能力についてアッセイした。例えば、100mMトリスHCl緩衝液(pH8.0)中の標準反応混合物(1mL)(0.5mMニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)(7.78mg/mLの50 μL)、5mMグルコース(180mg/mLの25 μL)及び1-50 μLのサンプルを含む)を30℃でインキュベートし、ニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の生成を₃₄₀でモニターすることによって活性を決定した。結果は表5に要約されている。期待したように、活性の大半は膜分画から回収された。大腸菌C41(DE3)+pETDuet1(陰性コントロール)は活性を全く欠いていた。

【0139】

表5：大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDH(CRS,配列番号:1;GDH,配列番号:9)及び大腸菌C41(DE3)+pETDuet1の種々の分画におけるグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)活性

| 試験 | 大腸菌分画 | 大腸菌C41(DE3)+pETDuet1全活性(nmol/分) | 大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS;omp-GDH全活性(nmol/分) |
|----|--------|---------------------------------|---|
| 1 | 無細胞抽出物 | 632.26 | 6275.02 |
| 2 | 可溶性分画 | 438.71 | 1055.72 |
| 3 | 膜分画 | 0.0 | 4290.32 |

10

20

【実施例11】

【0140】

大腸菌C41(DE3)における細胞質発現及び表面発現GDH(配列番号:9)の相対的発現レベル

組換え大腸菌C41(DE3)+pET29(a)-CRS+pET29(a)-GDH(CRS,配列番号:1;GDH,配列番号:9)及び大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH(CRS,配列番号:1;GDH,配列番号:9)のグルコースデヒドロゲナーゼ活性を、基質としてグルコースを用いてニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)の吸収増加を分光光度計により340nmでモニターすることによって決定した。50mMトリス-HCl緩衝液(pH8.0)中の反応混合物(1mL)は、0.5mMニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADP)⁺、10⁶-10⁸細胞及び5.0mMグルコースを含んでいた。活性1ユニットは、これらの条件下で1分毎に1 μmolのNADPの還元を触媒する細胞量(乾燥細胞重量)と定義された。細胞の表面でomp-GDH融合タンパク質としてGDHを発現する組換え大腸菌は683.52 × 10³ nmol/分/gm乾燥細胞の活性を示し、一方、細胞質でGDHを発現する大腸菌は41.87 × 10³ nmol/分/gm乾燥細胞の活性を示した。表面及び細胞質で発現されるGDHの相対的発現レベルはSDS-PAGEから概算した。細胞質発現は、組換え大腸菌の表面発現タンパク質と比較して約13.8倍高いと概算された。大腸菌C41(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDHは、組換え大腸菌C41(DE3)+pET29(a)-CRS+pET29(a)-GDHと比較して225倍高かった。結果は表6に要約されている。

30

40

【0141】

表6：omp-GDP(配列番号:9)融合タンパク質としてGDHを発現する組換え大腸菌及び細胞質でGDH(配列番号:9)を発現する組換え大腸菌の相対的活性

| 実験に使用したクローン | 活性(nmole/分/ gm DCW*) | GDHの 相対的濃度 | 活性/単位 GDH | 活性増加 の倍数 |
|---------------------------------------|--------------------------|---------------|--------------------------|-------------|
| 大腸菌C41(DE3)+pET29(a)-CRS+pET29(a)-GDH | 41.87 x 10 ³ | 13.8 | 3.03 x 10 ³ | 1 |
| 大腸菌C41(DE3)+pET Duet1-omp-CRS,omp-GDH | 683.52 x 10 ³ | 1 | 683.52 x 10 ³ | 225.58 |

*DCW = 乾燥細胞重量

#陰性コントロール大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)はいかなる活性も生じなかった。

10

【実施例 1 2】

【0 1 4 2】

生物触媒として形質転換大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (CRS, 配列番号:1) 又はC41(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (CRS, 配列番号:1) を用いるエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの生成

反応は、補助溶媒としてオートタイトレーター (718 STAT Titrino, Metrohm, スイス) 中のジエチルエーテルを用い2相系で実施した。大腸菌BL21(DE3)+pET23(a)-omp-CRS細胞又はC41(DE3)+pET23(a)-omp-CRS (1.38g ; 乾燥細胞重量基準) を20mLのリン酸緩衝液 (100mM, pH6.5) に懸濁した。15mLのジブチルエーテル中のグルコース (9g, 50mmol) 、グルコースデヒドロゲナーゼ (3600U) 、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP) (18mg, 0.02mmol) 及びECOB (6g, 36.5mmol) を前記懸濁物に添加し、内容物を磁気攪拌装置上にて穏やかに30 分で攪拌した。5MのNaOHで反応物のpHを6.5に維持した。反応の進行は以下のように1時間間隔でモニターした。各々0.2mLアリコットを取り出し、2mLの酢酸エチルで抽出した。有機相を遠心分離により分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ溶媒を除去して残留物を残し、前記を¹H NMRによって分析した。¹H NMRでは、ECOB中のCH₂Clに対応するメチレン基は 3.65の一重項として出現し、一方、前記は還元生成物ECH Bでは3.60でddとして出現した。これらのピークは¹H NMRで十分に分解されたセグメントとして出現するので、2つの化合物の混合物ではそれらの相対的濃度は、 3.60及び3.65における共鳴の相対的積分値を比較することによって容易に算出できる。

出発物質が存在しないことが反応混合物で示されたら、内容物を酢酸エチルで抽出した。有機相を遠心分離により分離し、硫酸ナトリウム上で乾燥させ溶媒を除去してエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを得た。エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの光学的純度を高速液体クロマトグラフィーで以下を用いて測定した：キラセルOB-H (ダイセル化学工業 (Daicel Chemical Industries) の製品) ；溶剤：ヘキサン/イソプロパノール = 96/4 ; 流速 : 1mL/分 ; 検出 : 217nm ; カラム温度 : 室温。

30

【実施例 1 3】

【0 1 4 3】

生物触媒として形質転換大腸菌BL21(DE3)+pETDuet1-omp-CRS,omp-GDH (CRS, 配列番号:1 ; GDH, 配列番号 : 9) 又は大腸菌C41(DE3)+pET Duet1-omp-CRS,omp-GDH (CRS, 配列番号 :1 ; GDH, 配列番号 : 9) を用いるエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの生成

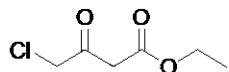
40

生成方法は、グルコースデヒドロゲナーゼが反応物に添加されなかつたことを除き実施例12に記載した方法と同じであった。

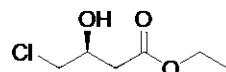
本発明の好ましい態様は以下の通りである。

1 . 配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性を有する、前記デザイナー細胞：

50



式 1



式 2

2. 配列リストの天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチド配列番号:1を細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約275倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

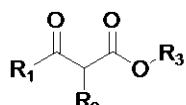
10

3. 配列リストの配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり15倍から26倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

4. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり少なくとも15倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

20

5. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式3の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から275倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。



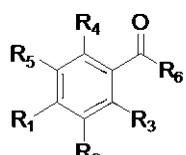
30

式 3

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。)

6. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを細胞の表面で発現し、配列リストの配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり50倍から180倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。

40



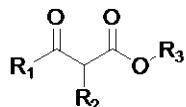
式 4

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。)

7. 配列リストの配列番号:1の天然に存在しないカルボニルレダクターゼポリペプチドを

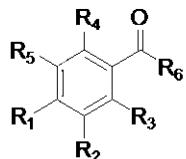
50

細胞の表面で発現し、配列番号:13の対応するカルボニルレダクターゼを下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり約3倍から15倍高い活性を有する、上記1に記載のデザイナー細胞。



式 3

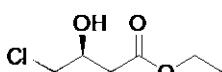
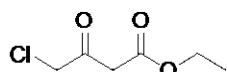
(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ であって；



式 4

式中、 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{R}_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $\text{R}_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)

8. 配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9又は11から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現するデザイナー細胞であって、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり250倍から300倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり200倍から250倍強化された活性を有する、前記デザイナー細胞。



式 1

式 2

9. 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換についてCRSポリペプチドの単位質量当たり約270倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化についてGDHポリペプチドの単位質量当たり約225倍強化された活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。

10. 配列番号:1、3、5又は7から選択される配列の天然に存在しないCRSポリペプチド、及び配列リストの配列番号:9、11、13又は15から選択される配列の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面で同時に発現し、配列リストの配列番号:13又は15又は17又は19の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21又は23の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約11倍から24倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量

10

20

30

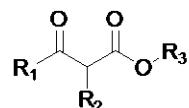
40

50

当たり9倍から31倍強化された活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。

11. 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートから式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートへの変換について単位細胞質量当たり約15倍高い活性、及びグルコースからグルコネートへの酸化について単位細胞質量当たり約16倍強化された活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。

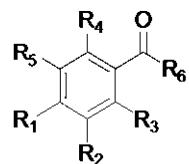
12. 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式3の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約55倍から270倍高い活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。10



式 3

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。)20

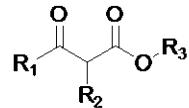
13. 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、CRSポリペプチドの単位質量当たり約40倍から156倍高い活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。



式 4

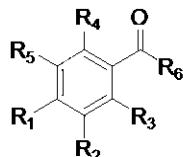
(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。)30

14. 配列番号:1の天然に存在しないCRSポリペプチド及び配列リストの配列番号:9の天然に存在しないGDHポリペプチドを細胞の表面に同時に発現し、配列リストの配列番号:13の対応するCRS及び配列リストの配列番号:21の対応するGDHを下記式3の化合物又は下記式4の化合物の還元のために細胞の細胞質で同時に発現するデザイナー細胞と比較して、単位細胞質量当たり約2倍から15倍高い活性を有する、上記8に記載のデザイナー細胞。40



式 3

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。)50

**式 4**

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。)

10

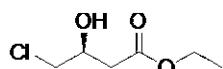
15. デザイナー細胞が、組換え大腸菌(Escherichia coli)BL21(DE3)、又は組換え大腸菌C41(DE3)、又は組換え大腸菌C43(DE3)である、上記1から14に記載のデザイナー細胞

16. カルボニルレダクターゼ活性を示す、配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列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含む組換え発現ベクター。

17. カルボニルレダクターゼ活性を示す配列番号:1又は3又は5又は7のアミノ酸配列を有するポリペプチド、及びGDH活性を示す配列番号:9又は11のアミノ酸配列有するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む組換え発現ベクター。

18. 下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約100%鏡像体過剰の製造のための上記1に記載のデザイナー細胞の使用。

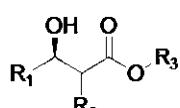
20

**式 2**

19. 式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートの約100%鏡像体過剰の製造のための上記8に記載のデザイナー細胞の使用。

20. 下記式5の化合物の製造のための上記1に記載のデザイナー細胞の使用。

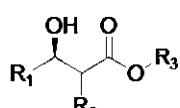
30

**式 5**

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。)

21. 下記式5の化合物の製造のための上記8に記載のデザイナー細胞の使用。

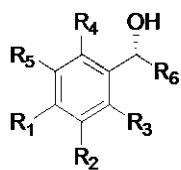
40

**式 5**

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。)

22. 下記式6の化合物の製造のための上記1に記載のデザイナー細胞の使用。

50

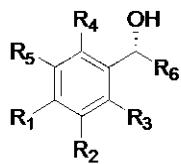


式 6

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。)

23. 下記式6の化合物の製造のための上記8に記載のデザイナー細胞の使用。

10

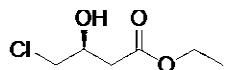


式 6

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である。)

24. 下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で製造する方法であって、

20

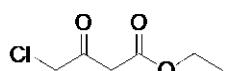


式 2

前記方法が、

f. 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、

30



式 1

g. 該エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、上記1に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させる工程、

h. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

40

i. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程、

j. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて当該生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程を含む、前記方法。

25. pHが、好ましくは6.5である、上記24に記載の方法。

26. 温度が、好ましくは30である、上記24に記載の方法。

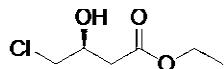
27. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記24に記載の方法。

28. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記24に記載の方法。

50

29. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記24に記載の方法。

30. 下記式2のエチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを約100%鏡像体過剰で製造する方法であつて、

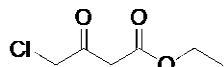


式 2

10

前記方法が、

a. 下記式1のエチル4-クロロ-3-オキソブチレートを提供する工程、



式 1

b. 該エチル4-クロロ-3-オキソブチレートを、上記8に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させる工程；

20

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程；

d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程；

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて当該生成物エチル(S)-4-クロロ-3-ヒドロキシブチレートを単離する工程を含む、前記方法。

31. pHが、好ましくは6.5である、上記30に記載の方法。

32. 温度が、好ましくは30 である、上記30に記載の方法。

33. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記30に記載の方法。

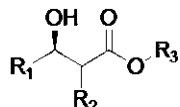
30

34. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記30に記載の方法。

35. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)である、上記30に記載の方法。

36. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記30に記載の方法。

37. 光学的に濃縮された下記式5の脂肪族アルコールを製造する方法であつて



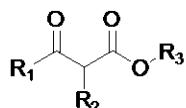
40

式 5

(式中、R₁ = CH₃、CH₂X、(CH₃)₂CH、CF₃又はCH₃(CH₂)_nであり、R₂ = H、X又はCH₃(CH₂)_nであり、R₃ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_mであり、X = Cl又はBrであり、n = 1 - 4であり、さらにm = 1 - 8である。)、

前記方法が、

f. 下記式3のケトンを提供する工程、

**式 3**

(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

g. 工程(a)で提供される式3のケトンを、上記1に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

h. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

i. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程、

j. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

38. pHが、好ましくは6.5である、上記37に記載の方法。

39. 温度が、好ましくは30である、上記37に記載の方法。

40. 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記37に記載の方法。

41. デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記37に記載の方法。

42. デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記37に記載の方法。

。

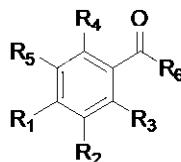
43. 光学的に濃縮された下記式6のアリールアルコールを製造する方法であって、

**式 6**

(式中、 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{R}_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $\text{R}_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)、

前記方法が、

f. 下記式4のケトンを提供する工程、

**式 4**

(式中、 $\text{R}_1 = \text{R}_2 = \text{R}_3 = \text{R}_4 = \text{R}_5 = \text{H}$ 、 CH_3 、 F 、 Cl 、 Br 、 I 、 CF_3 、 NO_2 又は OCH_3 であり、 $\text{R}_6 = \text{アルキル基}$ 、例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $n = 1$ から5である。)、

g. 工程(a)で提供される式3のケトンを、上記1に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及び100から500単位のグルコースデヒドロゲナーゼ及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応

10

20

30

40

50

混合物を形成する工程、

h . 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒 (例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル) を10 : 1から1 : 1の範囲の比率で添加する工程、

i . 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

j . 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式6の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

4 4 . pHが、好ましくは6.5である、上記43に記載の方法。

4 5 . 温度が、好ましくは30 である、上記43に記載の方法。

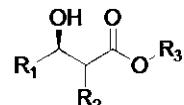
4 6 . 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記43に記載の方法。

10

4 7 . デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記43に記載の方法。

4 8 . デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記43に記載の方法

。
4 9 . 光学的に濃縮された下記式5の脂肪族アルコールを製造する方法であって、

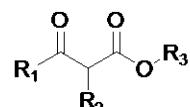
**式 5**

20

(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、 例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。) 、

前記方法が、

a . 下記式3のケトンを提供する工程、



30

式 3

(式中、 $\text{R}_1 = \text{CH}_3$ 、 CH_2X 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 CF_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_2 = \text{H}$ 、 X 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n$ であり、 $\text{R}_3 = \text{アルキル基}$ 、 例えば CH_3 又は $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_m$ であり、 $\text{X} = \text{Cl}$ 又は Br であり、 $n = 1 - 4$ であり、さらに $m = 1 - 8$ である。)

b . 工程 (a) で提供される式3のケトンを、上記8に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型 (NADPH) 及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

c . 工程 (b) で得られる反応混合物に有機溶媒 (例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル) を10 : 1から1 : 1の範囲の比率で添加する工程、

40

d . 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40 の一定の温度で混合する工程、

e . 工程 (d) で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式5の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

5 0 . pHが、好ましくは6.5である、上記49に記載の方法。

5 1 . 温度が、好ましくは30 である、上記49に記載の方法。

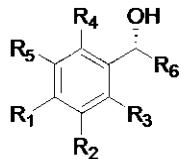
5 2 . 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記49に記載の方法。

5 3 . デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記49に記載の方法。

5 4 . デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記49に記載の方法

50

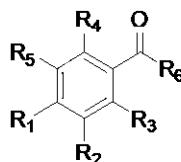
5 5 . 光学的に濃縮された下記式6のアリールアルコールを製造する方法であって、



式 6

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である)、
前記方法が、

a. 下記式4のケトンを提供する工程、



式 4

10

(式中、R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = R₅ = H、CH₃、F、Cl、Br、I、CF₃、NO₂又はOCH₃であり、R₆ = アルキル基、例えばCH₃又はCH₃(CH₂)_nであり、n = 1から5である)、

b. 工程(a)で提供される式3のケトンを、上記8に記載のデザイナー細胞並びに0.005から0.02モル%のニコチニアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型(NADPH)及びpH5.0から9.0の緩衝溶液と接触させて反応混合物を形成する工程、

c. 工程(b)で得られる反応混合物に有機溶媒(例えば酢酸エチル、酢酸ブチル、ジエチルエーテル、メチルn-ブチルエーテル又はジ-n-ブチルエーテル)を10:1から1:1の範囲の比率で添加する工程、

d. 該反応混合物を磁気攪拌装置上で活発に20から40の一定の温度で混合する工程、

30

e. 工程(d)で得られる生成物を酢酸エチル中で抽出し、続いて式6の化合物を単離する工程を含む、前記方法。

5 6 . pHが、好ましくは6.5である、上記55に記載の方法。

5 7 . 温度が、好ましくは30である、上記55に記載の方法。

5 8 . 有機溶媒が、好ましくはジ-n-ブチルエーテルである、上記55に記載の方法。

5 9 . デザイナー細胞が、組換え大腸菌BL21(DE3)、組換え大腸菌C41(DE3)、及び組換え大腸菌C43(DE3)から選択される組換え大腸菌株である、上記55に記載の方法。

6 0 . デザイナー細胞が、好ましくは組換え大腸菌C41(DE3)である、上記55に記載の方法

。

6 1 . アクセッショング番号MTCC No.5806、MTCC No.5807、MTCC No.5808及びMTCC No.5809を有するデザイナー細胞。

40

6 2 . アクセッショング番号MTCC5806 - 5809を有するデザイナー細胞が配列番号:1、3、5及び7を有するアミノ酸配列を発現する、上記61に記載のデザイナー細胞。

6 3 . 配列番号:1、3、5及び7を有するアミノ酸配列が配列番号:2、4、6、8を有するヌクレオチド配列と一致する、上記61 - 62に記載のデザイナー細胞。

6 4 . 配列番号:1 - 8が、天然に存在しないカルボニルレダクターゼ酵素配列である、上記61 - 63に記載のデザイナー細胞。

6 5 . 細胞表面で高活性のカルボニルレダクターゼを発現することができる、上記61 - 64に記載のデザイナー細胞。

6 6 . 配列番号:1 - 8を含みかつ該配列を発現することができる組換えベクター構築物。

50

67. 天然に存在しないカルボニルレダクターゼ酵素配列を含む、上記66に記載の組換えベクター構築物。

68. 細胞表面で高活性のカルボニルレダクターゼを発現することができる、上記66 - 67に記載の組換えベクター構築物。

69. アクセッショング番号MTCC No.5810、MTCC No.5811、MTCC No.5812、MTCC No.5813、MTCC No.5814、MTCC No.5815、MTCC No.5816及びMTCC No.5817を有するデザイナー細胞。

70. デザイナー細胞が、MTCC No.5810のアクセッショング番号を有し配列番号:1及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5811のアクセッショング番号を有し配列番号:1及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5812のアクセッショング番号を有し配列番号:3及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5813のアクセッショング番号を有し配列番号:3及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5814のアクセッショング番号を有し配列番号:5及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5815のアクセッショング番号を有し配列番号:5及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5816のアクセッショング番号を有し配列番号:7及び配列番号:9を有するアミノ酸配列を発現する、デザイナー細胞がMTCC No.5817のアクセッショング番号を有し配列番号:7及び配列番号:11を有するアミノ酸配列を発現する、上記69に記載のデザイナー細胞。

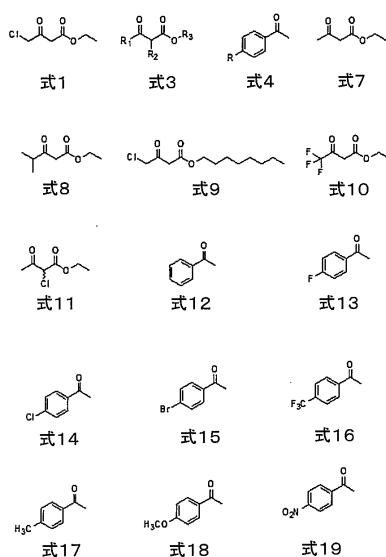
71. 配列番号:1、3、5、7、9及び11を有するアミノ酸配列が、配列番号:2、4、6、8、10及び12を有するヌクレオチド配列と一致する、上記69 - 70に記載のデザイナー細胞。

72. 酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコナーゼデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる、上記65 - 67に記載のデザイナー細胞。

73. 上記71に記載の配列を含み、さらに前記を発現することができる組換えベクター。

74. 酵素カルボニルレダクターゼ及びグルコナーゼデヒドロゲナーゼを細胞表面で一緒に共同発現することができる、上記73に記載の組換えベクター。

【図1】



【図2】

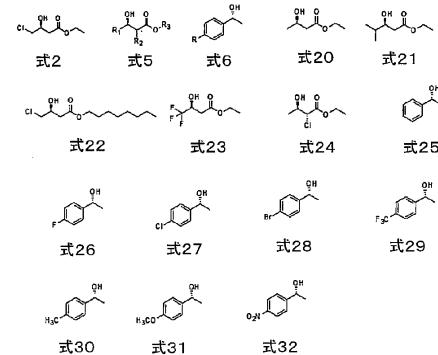


Figure 2: 生成物として適切な化合物の例

Figure 1: 基質として適切な脂肪族及び芳香族化合物の例

【図3】

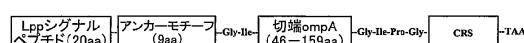


Figure 3: 配列番号:1、3、5又は7に対応する'CRSポリペプチド'の模式図

10

20

【図4】

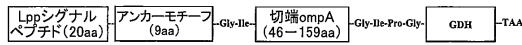


Figure 4:配列番号:9又は11に対応する'CRSポリペプチド'の模式図

【図6】

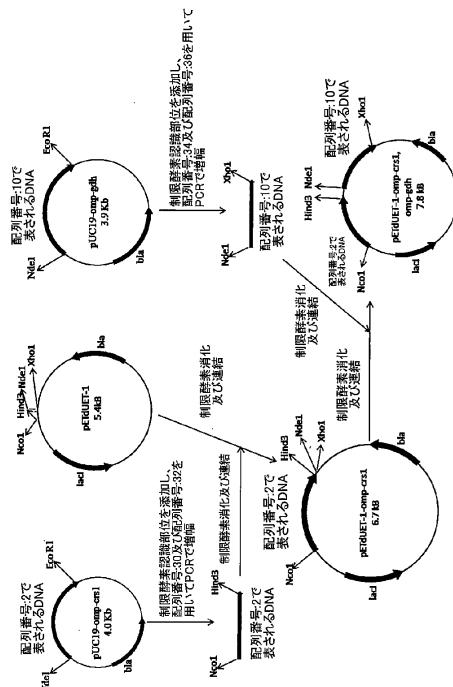


Figure 6:組換えベクターpETDuet1-omp-CRS omp-GDH

【図5】

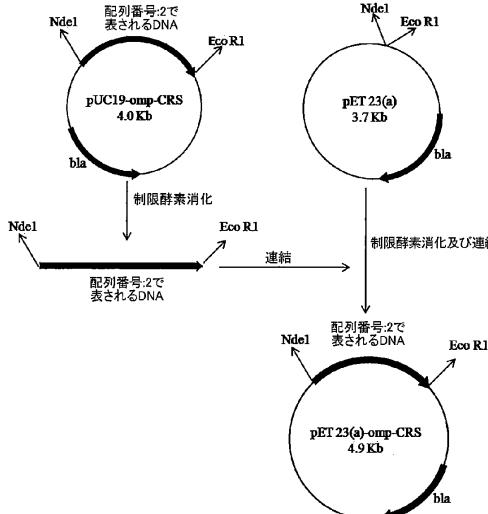


Figure 5:組換えベクターpET23(a)-omp-CRS

【図7】

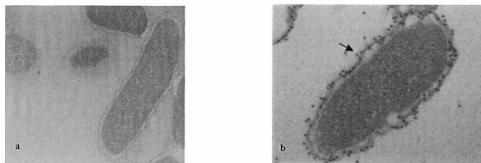


Figure 7: 'デザイナー全細胞生物触媒'のTEM

【配列表】

0006330028000001.app

フロントページの続き

| | |
|-------------------------|-----------------|
| (51)Int.Cl. | F I |
| C 1 2 P 41/00 (2006.01) | C 1 2 P 41/00 Z |
| C 1 2 N 9/04 (2006.01) | C 1 2 N 9/04 D |
| | C 1 2 N 9/04 Z |

微生物の受託番号 MTCC MTCC 5810
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5811
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5812
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5813
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5814
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5815
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5816
 微生物の受託番号 MTCC MTCC 5817

(74)代理人 100093300
 弁理士 浅井 賢治
 (74)代理人 100119013
 弁理士 山崎 一夫
 (74)代理人 100123777
 弁理士 市川 さつき
 (72)発明者 スリヴァスタヴァ ゴータム
 インド 160036 チャンディガル ポスト ボックス ナンバー 1304 セクター 3
 9エイ インスティテュート オブ マイクロバイアル テクノロジー内
 (72)発明者 カウル スニート
 インド 160036 チャンディガル ポスト ボックス ナンバー 1304 セクター 3
 9エイ インスティテュート オブ マイクロバイアル テクノロジー内
 (72)発明者 ジョリー ラヴィンダー シン
 インド 160036 チャンディガル ポスト ボックス ナンバー 1304 セクター 3
 9エイ インスティテュート オブ マイクロバイアル テクノロジー内

審査官 宮岡 真衣

(56)参考文献 米国特許出願公開第2007/0254368(US, A1)
 米国特許出願公開第2010/0028972(US, A1)
 SU Y. et al, Chinese Journal of Catalysis, Vol.33 Issue 10(2012), p.1650-1660
 FRANCISCO J.A. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol.89(1992), p.2713-2717

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 C 1 2 N 1 / 2 1
 C 1 2 N 1 5 / 0 9
 C 1 2 P 7 / 0 2 - 7 / 6 2
 C 1 2 P 4 1 / 0 0
 C 1 2 N 9 / 0 4
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)
 P u b M e d
 C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S / W P I D S (S T N)
 U n i P r o t / G e n e S e q
 G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

