

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3574682号

(P3574682)

(45) 発行日 平成16年10月6日(2004.10.6)

(24) 登録日 平成16年7月9日(2004.7.9)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N 15/09
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 9/04

E

請求項の数 16 (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平6-181308
 (22) 出願日 平成6年8月2日(1994.8.2)
 (65) 公開番号 特開平7-231785
 (43) 公開日 平成7年9月5日(1995.9.5)
 審査請求日 平成12年6月5日(2000.6.5)
 (31) 優先権主張番号 特願平5-261649
 (32) 優先日 平成5年9月24日(1993.9.24)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願平5-337191
 (32) 優先日 平成5年12月28日(1993.12.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000002901
 ダイセル化学工業株式会社
 大阪府堺市鉄砲町1番地
 (74) 代理人 100075258
 弁理士 吉田 研二
 (74) 代理人 100096976
 弁理士 石田 純
 (72) 発明者 小島 智子
 茨城県つくば市梅園2-3-11
 (72) 発明者 山本 浩明
 茨城県つくば市千現1-14-14-103
 (72) 発明者 河田 直紀
 茨城県つくば市千現1-14-14-304

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規な酵素、該酵素を製造する方法、該酵素をコードするDNA、該DNAを含む形質転換体、該酵素による光学活性アルコール等の製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

次の(1)から(7)に示す理化学的性質を有する酵素。

(1) 作用

NAD⁺ (酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を補酵素として、アルコールを酸化し、ケトン又はアルデヒドを生成する。また、NADH (還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド)を補酵素として、ケトン又はアルデヒドを還元し、アルコールを生成する。

(2) 基質特異性

芳香族置換を含む脂肪族アルコールを酸化反応の基質とする。1級アルコールに比較して2級アルコールに対して活性が高い。2-ブタノールのR体に比較し2-ブタノールのS体を優先的に酸化する。

アルデヒド又は芳香族置換を含む脂肪族ケトン還元反応の基質とする。

(3) 分子量

SDS-PAGEで測定した場合、4万。

(4) 至適pH及び安定pH範囲

(S)-2-ブタノール酸化反応の至適pHは8.5~9.5である。2-ブタノン還元反応の至適pHは5.5~6.5である。安定pH範囲はpH8.0~10.0である。

(5) 作用適温の範囲

作用適温の範囲は25~55である。

(6) 温度による失活の条件

40 10 分間の熱処理後でも90%以上の残存活性を有する。

(7) 阻害及び安定化

パラヒドロキシ安息香酸、塩化水銀、塩化銅、塩化亜鉛、N-エチルマレイミドなどのSH試薬で阻害され、還元剤の2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールで阻害され、o-フェナントロリンで阻害されるが、エチレンジアミン4酢酸では阻害されない。

【請求項2】

キャンディダ(Candida)属に属し請求項1の酵素を産生する微生物を培養し、培養物から該酵素を取得することを特徴とする、請求項1記載の酵素の製造方法。

【請求項3】

請求項2記載の方法において、キャンディダ属に属する微生物が、キャンディダ・パラブシロシス(Candida parapsilosis)であることを特徴とする方法。

【請求項4】

配列番号：1に記載された塩基配列で表される請求項1記載の酵素をコードするDNA。

【請求項5】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換、および/または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするDNA。

【請求項6】

請求項5記載のDNAにおいて、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNA。

【請求項7】

配列番号：2に記載されたアミノ酸配列からなる蛋白質。

【請求項8】

配列番号：2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、挿入、置換、および/または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質。

【請求項9】

請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAを含むことを特徴とするベクター。

【請求項10】

請求項4～6のいずれか1項に記載のDNAによって形質転換された微生物。

【請求項11】

請求項10に記載の微生物を培養し、培養物から請求項1記載の酵素を取得することを特徴とする、請求項1記載の酵素の製造方法。

【請求項12】

請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物を、ケトン又はアルデヒドに作用させ、該ケトン又はアルデヒドを還元してアルコールを製造することを特徴とする、アルコールの製造方法。

【請求項13】

請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物を、非対称ケトンに作用させ、該非対称ケトン還元して光学活性アルコールを製造することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法。

【請求項14】

請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物をアルコールに作用させ、該アルコールを酸化してケトン又はアルデヒドを製造することを特徴とする、ケトン又はアルデヒドの製造方法。

【請求項15】

請求項1に記載の酵素、又は該酵素を産生する微生物もしくはその処理物をラセミ体アルコールに作用させ、光学異性体の一方を優先的に酸化し、残存する光学活性アルコールを取得することを特徴とする、光学活性アルコールの製造方法。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

請求項 10 に記載の微生物由来の酵素、又は請求項 10 に記載の微生物もしくはその処理物を作用させることを特徴とする請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、アルコール、アルデヒド、ケトンの製造、特に光学活性アルコールの製造に有用な新規な 2 級アルコール脱水素酵素、該酵素の製造方法、該酵素をコードする DNA、該 DNA により形質転換された微生物、及び該酵素を用いてアルコール、アルデヒド、ケトン、特に光学活性アルコールを製造する方法に関する。

10

【0002】

【従来技術】

微生物が産生する 2 級アルコール脱水素酵素としては、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ジン酸（以下、 $NADP^+$ と略す）を要求するサーモアナエロビウム・ブロッキー（*Thermoanaerobium brockii*）由来のアルコール脱水素酵素（*J. Am. Chem. Soc.* 108, 162-169 (1986)）が知られている。また、補酵素としてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（以下、 NAD^+ と略す）を要求する 2 級アルコール脱水素酵素としては、ピキア・エスピー NRRL-Y-11328（*Pichia sp.* NRRL-Y-11328: *Eur. J. Biochem.* 101, 401-406 (1979)）、シュードモナス・エスピー SPD6（*Pseudomonas sp.* SPD6: *Bioorg. Chem.* 19, 398-417 (1991)）、シュードモナス・フルオレッセンス NRRL B-1244（*Pseudomonas fluorescens* NRRL B-1244: 特開昭59-17982号）、シュードモナス・マルトフィラ MB11L（*Pseudomonas maltophilia* MB11L: *FEMS Microbiol. Lett.* 93, 49-56 (1992)）、シュードモナス・エスピー PED（*Pseudomonas sp.* PED: *J. Org. Chem.* 57, 1526-1532 (1992)）、シュードモナス・エスピー ATCC 21439（*Pseudomonas sp.* ATCC 21439: *Eur. J. Biochem.* 119, 359-364 (1981)）、キャンディダ・ボイディニー SAHM（*Candida boidinii* SAHM: *Biochim. Biophys. Acta* 716, 298-307 (1992)）、ミコバクテリウム・バカエ JOB-5（*Mycobacterium vaccae* JOB-5: *J. Gen. Microbiol.* 131, 2901-2907 (1985)）、ロドコッカス・ロドクロウス PNKb1（*Rhodococcus rhodochrous* PNKb1: *Arch. Microbiol.* 153, 163-168 (1990)）、コマモナス・テリゲナ（*Comamonas terrigena*: *Biochim. Biophys. Acta* 661, 74-86 (1981)）、アースロバクター・エスピー SBA（*Arthrobacter sp.* SBA: 特開昭51-57882号）由来の酵素が報告されている。

20

30

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、これらの 2 級アルコール脱水素酵素の立体選択性は満足できるものではない。例えば、2 級アルコール脱水素酵素の基質として最も報告の多い 2 - ブタノールに対して、(S) - 2 - ブタノールを立体選択的に酸化し、2 - ブタノンを生産する活性を有する酵素は知られていない（シュードモナス・エスピー ATCC 21439、シュードモナス・エスピー SPD6、コマモナス・テリゲナ、キャンディダ・ボイディニー SAHM 又はピキア・エスピー NRRL-Y-11328 が産生する酵素においては R 体が優先的に酸化され、シュードモナス・フルオレッセンス NRRL B-1244 が産生する酵素においては立体選択性を示さず、ミコバクテリウム・バカエ JOB-5、ロドコッカス・ロドクロウス PNKb1、シュードモナス・エスピー PED 又はシュードモナス・マルトフィラ MB11L が産生する酵素においてはその立体選択性は記載されていない）。なお、パン酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）由来の 1 級アルコール脱水素酵素（SADH I）は、2 - ブタノールに関しては S 体を優先的に酸化するという報告があるが（*Arch. Biochem. Biophys.*, 126, 933-944 (1968)、*J. Biol. Chem.*, 268, 7792-7798 (1993)）、その相対活性はエタノールの 1 % 程度と極めて低く、到底実用に耐えられるものではない。

40

【0004】

即ち、(S) - 2 - ブタノールを優先的に酸化する 2 級アルコール脱水素酵素はこれまで知られておらず、立体選択性の高い 2 級アルコール脱水素酵素を見い出すことが強く望ま

50

れていた。

【0005】

また、該酵素の遺伝子をクローニングできれば、遺伝子工学の手法を用いて該酵素を大量に製造することが可能となるので、該酵素をコードする遺伝子をクローニングすることが強く望まれていた。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、(S)-2-ブタノールを優先的に酸化する能力を有する微生物を広くスクリーニングし、キャンディダ属に属する微生物、特にキャンディダ・パラプシロシス (Candida parapsilosis) が(S)-2-ブタノールを優先的に酸化する能力を有することを見いだした。更に、この微生物を培養し、その菌体より(S)-2-ブタノールを酸化する酵素を精製した。そして、その性質を検討した結果、該酵素が(S)-2-ブタノールを高い立体選択性を持って酸化すること、更に(S)-2-ブタノール以外の多くの2級アルコールを立体選択的に酸化することを見いだした。

10

【0007】

即ち、本発明は、次の(1)から(9)に示す理化学的性質を有する酵素を提供する。

(1)作用

NAD⁺を補酵素として、アルコールを酸化し、ケトン又はアルデヒドを生成する。また、NADHを補酵素として、ケトン又はアルデヒドを還元し、アルコールを生成する。

【0008】

20

(2)基質特異性

芳香族置換を含む脂肪族アルコールを酸化反応の基質とする。1級アルコールに比較して2級アルコールに対して活性が高い。2-ブタノールのR体に比較し2-ブタノールのS体を優先的に酸化する。

【0009】

アルデヒド又は芳香族置換を含む脂肪族ケトン還元反応の基質とする。

【0010】

(3)分子量

SDS-PAGEで測定した場合、4万。

なお、本発明の酵素の上記以外の理化学的性質、及び酵素学的性質は以下の通りである。

30

【0011】

(4)至適pH及び安定pH範囲

(S)-2-ブタノール酸化反応の至適pHは8.5~9.5である。2-ブタノン還元反応の至適pHは5.5~6.5である。

【0012】

pH8.0~10.0で比較的安定である。

【0013】

(5)作用適温の範囲

25~55 で活性が高く、50 が至適温度である。

【0014】

40

(6)温度による失活の条件

40 10分間の熱処理後でも90%以上の残存活性を有する。

【0015】

(7)阻害及び安定化

パラヒドロキシ安息香酸、塩化水銀、塩化銅、塩化亜鉛、N-エチルマレイミドなどのSH試薬で阻害される。還元剤の2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトールで阻害され、o-フェナントロリンで阻害されるが、エチレンジアミン4酢酸では阻害されない。

【0016】

(8)精製方法

通常のタンパク質の精製方法を適当に組み合わせることにより精製することができる。例

50

えば、菌体を破碎後、プロタミン硫酸沈澱を行い、その遠心分離上清を硫酸アンモニウムを用いて塩析し、更に、陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過を組み合わせることにより、ドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動（以下、SDS-PAGEと略す）で単一バンドになるまで精製することができる。

【0017】

(9) 等電点

等電点電気泳動に於いていくつかのバンドを生成するが、主要なバンドの等電点は、6.7であった。

【0018】

なお、本明細書中の実施例を含む全ての2級アルコール脱水素酵素活性の測定は、以下に示す方法により行った。即ち、トリス - 塩酸緩衝液 (pH9.0) 50 μ mol, NAD⁺ 2.5 μ mol, (S) - 2 - ブタノール50 μ mol 及び酵素を含む反応液中30 で反応させ、NADHの生成に由来する340nmの吸光度の増大を測定した。1Uは、1分間に1 μ molのNADHの生成を触媒する酵素量とした。

【0019】

また、本発明は、2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAを提供する。

即ち、本発明者らは、精製した2級アルコール脱水素酵素をリジルエンドペプチダーゼにより消化し、逆相HPLCにより切断された断片を精製後、プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列の一部を決定した。得られたアミノ酸配列をもとにして、PCR (Polymerase Chain Reaction) 用プライマーを合成し、キャンディダ・パラブシロシス (Candida parapsilosis) の染色体DNAを鋳型としたPCRを行い、2級アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子の一部を増幅し、その塩基配列 (コア配列) を明らかにした。更に、得られたDNA配列 (コア配列) の周辺領域の塩基配列を明らかにするために、キャンディダ・パラブシロシス (Candida parapsilosis) の染色体DNAをコア配列中にその認識配列が存在しない制限酵素 HaeII により消化し、生成したDNA断片をT4リガーゼにより自己環化し、逆PCR (Nucleic Acids Res. 16, 8186 (1988)) 用の鋳型DNAを調製した。次に、コア配列をもとに、コア配列の外側に向かうDNA合成の開始点となるプライマーを合成し、逆PCRによりコア配列の周辺領域を増幅した。得られたDNAの塩基配列を明らかにした結果、自己環化したDNA中に、図6、7、8に示す2級アルコール脱水素酵素の全コード領域が含まれていることを確認した。更に、クローニングした遺伝子の大腸菌宿主中での発現産物が、キャンディダ・パラブシロシス由来の2級アルコール脱水素酵素と同様の活性を有することを確認した。

【0020】

本願発明の、2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAは、2級アルコール脱水素酵素の活性を有していて、アミノ酸配列が実質的に図6、7、8に示されているおよび配列番号：2に記載の蛋白質をコードする塩基配列を含むことを特徴とする。ここで「実質的」とは、2級アルコール脱水素酵素の活性を有する限り、図6、7、8に示したおよび配列番号：2に記載のアミノ酸配列についてアミノ酸のいくつかの欠失、挿入、置換等があってもよいことを示すものである。本発明のDNAには、図6、7、8に示したおよび配列番号：1に記載の1008塩基からなるDNAが含まれることはいうまでもないが、本願発明はこれに限られるものではない。なお、DNAがコードするアミノ酸配列についてアミノ酸のいくつかの欠失、挿入、置換等を生じるようにDNAを改変することは、合成オリゴヌクレオチドを用いた部位特異的変異導入法など、周知の方法で適宜行うことができる。また、図6、7、8に示したおよび配列番号：1に記載の1008塩基を含むDNAまたは該DNAを適宜改変したDNAを鋳型にして、PCR法をMn²⁺イオンの存在下 (通常0.5 ~ 1.0 mMの濃度) または特定のヌクレオチドの濃度を低くして行うことによつて、ランダムに変異が導入されたDNAを得ることができる。このようにして得られたDNAのうち、2級アルコール脱水素酵素の活性を有するタンパク質をコードするものが、本願発明に含まれることはいうまでもない。

10

20

30

40

50

【0021】

更に本発明は、アミノ酸配列が実質的に図6、7、8に示されている、および配列番号：2に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAにより形質転換された、2級アルコール脱水素酵素生産能を有する微生物を提供する。

【0022】

本発明において形質転換の対象となる微生物は、2級アルコール脱水素酵素活性を有するポリペプチドをコードするDNAにより形質転換され、2級アルコール脱水素酵素活性を発現することができる微生物であればいかなるものでもよく、具体的には、イシェリヒア (*Escherichia*) 属、バチルス (*Bacillus*) 属、シュードモナス (*Pseudomonas*) 属、セラチア (*Serratia*) 属、ブレビバクテリウム (*Brevibacterium*) 属、コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属、ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属、ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属など宿主、ベクター系の開発されている細菌、サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、クライベロマイセス (*Kluyveromyces*) 属、シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属、チゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*)、ヤロウイア (*Yarrowia*) 属、トリコスポロン (*Trichosporon*) 属、ロドスポリジウム (*Rhodospiridium*) 属、ハンゼヌラ (*Hansenula*) 属、ピキア (*Pichia*) 属、キャンディダ (*Candida*) 属などの酵母、ノイロスポラ (*Neurospora*) 属、アスペルギルス (*Aspergillus*) 属、セファロスפורリウム (*Cephalosporium*) 属、トリコデルマ (*Trichoderma*) 属などに属するカビなどが含まれる。

10

【0023】

形質転換体の作製のための手順ないし、方法そのものは、分子生物学、生物工学、遺伝子工学の分野において慣用されている技術に準じて行うことができる。

20

【0024】

微生物中において、本発明の遺伝子を発現させるためには、まず微生物中において安定に存在するプラスミドベクターやファージベクター中にこの遺伝子を挿入する必要がある。また、本発明のDNAを微生物中で発現させるためには、それが有する遺伝情報を転写・翻訳させる必要がある。そのためには、転写・翻訳を制御するユニットにあたるプロモーターを本発明のDNAの5'-側上流に、ターミネーターを3'-側下流に、それぞれ組み込めばよい。このプロモーター、ターミネーターとしては、宿主として利用する微生物中において機能することが知られているプロモーター、ターミネーターを用いる必要がある。これら各種微生物において利用可能なベクター、プロモーター、ターミネーターなどに関して「微生物学基礎講座8 遺伝子工学・共立出版」、特に酵母に関しては「Adv. Biochem. Eng. 43, 75-102 (1990)」又は「Yeast 8, 423-488 (1992)」などに詳細に記述されている。

30

【0025】

例えば、イシェリヒア属特に大腸菌イシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) においては、プラスミドベクターとして、pBR, pUC 系プラスミドを利用することが可能であり、lac(- ガラクトシダーゼ), trp(トリプトファンオペロン), tac(lac, trp の融合), ファージ PL, PR などに由来するプロモーターなどが利用できる。また、ターミネーターとしては、trpA 由来、ファージ由来 rrnB リボソーマルターミネーターなどを用いることができる。

40

【0026】

バチルス属においては、ベクターとしてpUB110系プラスミド、pC194 系プラスミドなどが利用可能であり、染色体に直接挿入させることもできる。また、プロモーター、ターミネーターとして apr(アルカリプロテアーゼ), npr(中性プロテアーゼ), amy(- アミラーゼ) などが利用できる。

【0027】

シュードモナス属においては、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・セパシア (*Pseudomonas cepacia*) などで宿主ベクター系が開発されており、トルエン化合物の分解に関与するプラスミド TOL プラスミドを基本にした広宿主域ベクター (RSF1010 などに由来する自律的複製に必要な遺伝子を含む) pKT240 などが利用可能で

50

あり、プロモーター、ターミネーターとして、リパーゼ遺伝子（特開平5-284973号）などが利用できる。

【0028】

ブレヴィバクテリウム属、特にブレヴィバクテリウム・ラクトファーメンタム (*Brevibacterium lactofermentum*) においては、pAJ43 (Gene 39, 281 (1985)) などのプラスミドベクターが利用可能であり、プロモーター、ターミネーターとしては、大腸菌で使用されているプロモーター、ターミネーターがそのまま利用可能である。

【0029】

コリネバクテリウム属、特にコリネバクテリウム・グルタミカム (*Corynebacterium glutamicum*) においては、pCS11 (特開昭57-183799号), pCB101 (Mol.Gen.Genet. 196, 175 (1984)) などのプラスミドベクターが利用可能である。 10

【0030】

ストレプトコッカス (*Streptococcus*) 属においては、pHV1301 (FEMS Microbiol.Lett. 26, 239 (1985)), pGK1 (Appl.Environ.Microbiol. 50, 94 (1985)) などがプラスミドベクターとして利用可能である。

【0031】

ラクトバチルス (*Lactobacillus*) 属においては、ストレプトコッカス属用に関与された pAM 1 (J.Bacteriol. 137, 614 (1979)) などが利用可能であり、プロモーターとして大腸菌で利用されているものが利用可能である。

【0032】

サッカロマイセス (*Saccharomyces*) 属、特にサッカロマイセス・セレビジアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、YRp系, YEp系, YCp系, YIp系プラスミドが利用可能であり、染色体内に多コピー存在するリボソームDNAとの相同組換えを利用したインテグレーションベクター (EP 537456 など) は、多コピーで遺伝子を導入でき、かつ安定に遺伝子を保持できるため極めて有用である。また、ADH(アルコール脱水素酵素), GAPDH(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素), PHO(酸性フォスファターゼ), GAL(ガラクトシダーゼ), PGK(ホスホグリセレートキナーゼ), ENO(エノラーゼ) などのプロモーター、ターミネーターが利用可能である。 20

【0033】

クライベロマイセス属、特にクライベロマイセス・ラクティス (*Kluyveromyces lactis*) においては、サッカロマイセス・セレビジアエ由来 2 μ m系プラスミド, pKD1系プラスミド (J.Bacteriol. 145, 382-390 (1981)), キラー活性に関与する pGKI1由来プラスミド, クライベロマイセス属における自律増殖遺伝子 KARS系プラスミド, リボソームDNAなどとの相同組換えにより染色体中にインテグレート可能なベクタープラスミド (EP 537456 など) などが利用可能である。また、ADH, PGKなどに由来するプロモーター、ターミネーターが利用可能である。 30

【0034】

シゾサッカロマイセス (*Schizosaccharomyces*) 属においては、シゾサッカロマイセス・ボンベ由来の ARS (自律複製に関与する遺伝子) 及びサッカロマイセス・セレビジアエ由来の栄養要求性を相補する選択マーカーを含むプラスミドベクターが利用可能である (Mol. Cell.Biol. 6, 80 (1986))。また、シゾサッカロマイセス・ボンベ由来の ADH プロモーターなどが利用できる (EMBO J. 6, 729 (1987))。 40

【0035】

チゴサッカロマイセス属 (*Zygosaccharomyces*) においては、チゴサッカロマイセス・ロウキシ (*Zygosaccharomyces rouxii*) 由来の pSB3 (Nucleic Acids Res. 13, 4267 (1985)) などに由来するプラスミドベクターが利用可能であり、サッカロマイセス・セレビスエ由来 PH05 プロモーターや、チゴサッカロマイセス・ロウキシ由来 GAP-Zr(グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素) のプロモーター (Agri.Biol.Chem. 54, 2521 (1990)) などが利用可能である。

【0036】

ハンゼヌラ(Hansenula) 属においては、ハンゼヌラ・ポリモルファ(Hansenula polymorpha)において宿主ベクター系が開発されている。ベクターとしては、ハンゼヌラ・ポリモルファ由来自律複製に関与する遺伝子(HARS1, HARS2)も利用可能であるが、比較的不安定であるため、染色体への多コピーインテグレーションが有効である(Yeast 7, 431-443 (1991))。また、メタノールなどで誘導される AOX(アルコールオキシダーゼ), FDH(ギ酸脱水素酵素)のプロモーターなどが利用可能である。

【0037】

ピキア(Pichia)属においては、ピキア・パストリス(Pichia pastoris)などにピキア由来自律複製に関与する遺伝子(PARS1, PARS2)などを利用した宿主ベクター系が開発されており(Mol.Cell.Biol. 5, 3376 (1985))、高濃度培養とメタノールで誘導可能な AOX など強いプロモーターが利用できる(Nucleic Acids Res. 15, 3859 (1987))。

10

【0038】

カンディダ(Candida) 属においては、カンディダ・マルトーサ(Candida maltosa)、カンディダ・アルビカンス(Candida albicans)、カンディダ・トロピカリス(Candida tropicalis)などにおいて宿主ベクター系が開発されている。カンディダ・マルトーサにおいてはカンディダ・マルトーサ由来 A R S がクローニングされ(Agri.Biol.Chem. 51, 51, 1587 (1987))、これを利用したベクターが開発されている。

【0039】

アスペルギルス(Aspergillus) 属においては、カビの中で最もよく研究されており、プラスミドや染色体へのインテグレーションが利用可能であり、菌体外プロテアーゼやアミラーゼ由来のプロモーターが利用可能である(Trends in Biotechnology 7, 283-287 (1989))。

20

【0040】

トリコデルマ(Trichoderma) 属においては、トリコデルマ・リーゼイ(Trichoderma reesei)を利用したホストベクター系が開発され、菌体外セルラーゼ遺伝子由来プロモーターなどが利用できる(Biotechnology 7, 596-603 (1989))。

【0041】

本発明の酵素は、カンディダ(Candida)属に属する下記(1)から(3)に示す性質を有する酵素を産生する微生物もしくはその変異株、又は該酵素をコードする遺伝子を異種の微生物宿主に導入し該酵素生産能を付与された遺伝子組換え体を培養することにより製造することができる。

30

【0042】

(1)作用

NAD^+ を補酵素として、アルコールを酸化し、ケトン又はアルデヒドを生成する。また、 $NADH$ を補酵素として、ケトン又はアルデヒドを還元し、アルコールを生成する。

【0043】

(2)基質特異性

芳香族置換を含む脂肪族アルコールを酸化反応の基質とする。1級アルコールに比較して2級アルコールに対して活性が高い。2 - ブタノールの R 体に比較し 2 - ブタノールの S 体を優先的に酸化する。

40

【0044】

アルデヒド又は芳香族置換を含む脂肪族ケトン還元反応の基質とする。

【0045】

(3)分子量

S D S - P A G E で測定した場合、4 万。

【0046】

更に、本発明の2級アルコール脱水素酵素、又は該酵素を含む微生物(変異株や遺伝子組換え微生物を含む)もしくはその処理物を、芳香族で置換されてもよい脂肪族2級アルコール、例えば、2 - ブタノール、2 - オクタノール、フェニルエタノール、1, 3 - ブタンジオール、- ヒドロキシ - n - 酪酸エチルエステルなどのラセミ体アルコールに作用

50

させ、光学異性体の一方（2-ブタノール、2-オクタノール、フェニルエタノール、1,3-ブタンジオール、 α -ヒドロキシ-n-酪酸エチルエステルにおいてはそのS体）のみを酸化することにより、他方の光学活性アルコール（2-ブタノール、2-オクタノール、フェニルエタノール、1,3-ブタンジオール、 α -ヒドロキシ-n-酪酸エチルエステルにおいてはそのR体）を生産することができる。この酸化反応により補酵素NAD⁺は還元され、NADHが生成する。

【0047】

生成したNADHは、例えば、微生物の有するNADHをNAD⁺に変換する能力により、NAD⁺に変換（再生）されることができる。また、グルタミン酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素、NADH脱水素酵素、NADHオキシダーゼなどのNADHをNAD⁺に酸化する活性を有する酵素、又はこれら酵素を含有する微生物もしくはその処理物を反応系に添加することにより、NAD⁺を再生することもできる。また、本発明の酵素の基質特異性を利用して、反応系にアセトン、2-ブタノンなどの安価な本酵素の還元反応の基質を共存させることにより、1種類の酵素でNAD⁺の再生も同時に行うことができる。

10

【0048】

また、ケトン体に本発明の2級アルコール脱水素酵素、又は該酵素を産生する微生物（変異株や形質転換微生物を含む）もしくはその処理物を作用させ、光学活性なアルコールを生産することができる。例えば、2-ブタノンから(S)-2-ブタノール、2-オクタノンから(S)-2-オクタノール、アセトフェノンから(S)-1-フェニルエタノール、4-ヒドロキシ-2-ブタノンから(S)-1,3-ブタンジオール、アセト酢酸エステルから(S)- α -ヒドロキシ-n-酪酸エステルなどを生産することができる。この還元反応により補酵素NADHは酸化され、NAD⁺が生成する。

20

【0049】

生成したNAD⁺は、例えば、微生物の有するNAD⁺をNADHに変換する能力により、NADHに変換（再生）されることができる。このNAD⁺還元活性は、反応系にグルコース、エタノール、ギ酸などを添加することにより促進することが可能である。また、反応系に、ギ酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、グルコース脱水素酵素などのNAD⁺をNADHへ還元する能力を有する酵素、又はこれら酵素を含む微生物もしくはその処理物を添加することにより、NAD⁺の還元を行うこともできる。また、本発明の酵素の基質特異性を利用して、反応系にイソプロパノールやエタノールなどの酸化反応の基質を添加することにより、1種類の酵素でNADHの再生反応を同時に行うこともできる。

30

【0050】

【実施例】

以下、実施例により本発明を更に詳しく説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。

【0051】

[実施例1]（2級アルコール脱水素酵素の精製）

キャンディダ・パラプシロシス IF0 1396 株をYM培地（グルコース10g、バクトペプトン5g、酵母エキス3g、麦芽エキス3g/L、pH6.0）で培養し、遠心分離により菌体を調製した。

40

【0052】

得られた湿菌体を超高圧細胞破碎装置により菌体を破碎後、遠心分離により菌体残渣を除去し、無細胞抽出液を得た。この無細胞抽出液にプロタミン硫酸を添加し、核酸及びミクロゾームを除去した。遠心分離により得られた上清に、硫酸を添加して70%飽和において沈澱した画分を回収した。更に、Q-セファロースFFを用いたアニオン交換クロマトグラフィーを行い、塩化ナトリウムの濃度勾配溶出を行い、2級アルコール脱水素酵素活性を有するピークを回収した。得られた画分を1.62M硫酸を含む緩衝液で平衡化したフェニル-セファロースに添加し、疎水クロマトグラフィーを行った。硫酸濃度を0Mまで減少させ、2級アルコール脱水素酵素活性画分を回収した（酵素活性の測定法は前述の

50

方法で行った)。この活性画分をレッド - セファロースのアフィニティーカラムに添加し、素通り画分をスーパーデックス 200 のゲルろ過カラムに添加し、ゲルろ過を行った。活性画分を回収し、モノ Q カラムに添加し、塩化ナトリウムの濃度勾配を用いて陰イオン交換クロマトグラフィーを行い、活性画分を SDS - PAGE で純度検定を行い、単一バンドを示す画分のみを回収した。

【 0 0 5 3 】

得られた 2 級アルコール脱水素酵素標品は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Native-PAGE) において 1 本メジャーなバンドと近接する数本の薄いバンドがみられた。活性染色の結果、全てのバンドが 2 級アルコール脱水素酵素活性を有しており、この酵素標品を SDS - PAGE で解析した結果、単一バンドであった。

10

【 0 0 5 4 】

SDS - PAGE におけるバンドの分子量は、約 40000 であった (図 1)。

【 0 0 5 5 】

精製の要約を表 1 に示したが、精製酵素の比活性は、1370 U / mg - 蛋白質であった。

【 0 0 5 6 】

【表 1】

	容量 (mL)	総蛋白量 (mg)	総活性 (U)	比活性 (U/mg)	収率 (%)
粗抽出液	4800	157000	40100	0.255	100.0
プロタミン硫酸	5200	94600	35200	0.371	87.6
0-70%硫酸アモニウム沈殿	550	78700	30700	0.390	76.5
Q-セファロース FF	550	8870	9730	1.10	24.2
フェニル-セファロース	22	191	5440	28.5	13.6
レッド-セファロース	2.4	22.1	6150	279	15.3
ス-パ-デックス 200	5.34	3.7	3140	846	7.8
モノ Q	1.05	1.7	2360	1370	5.9

20

30

【 実施例 2 】 (2 級アルコール脱水素酵素の至適 pH)

2 級アルコール脱水素酵素をカリウム - リン酸緩衝液 (KPB)、トリス - 塩酸緩衝液 (Tris-HCl)、ブリットン - ロビンソン緩衝液を用いて pH を変化させて (S) - 2 - ブタノールの酸化活性、2 - ブタノンの還元活性 ((S) - 2 - ブタノール 酸化活性測定時の条件で NAD⁺ を NADH (0.4 μmol) に代えて測定し、NADH の減少に伴う 340nm の吸光度の減少を測定したものを測定した。最大活性を 100 とした相対活性で表し、図 2、図 3 に示した。反応の至適 pH は、(S) - 2 - ブタノール酸化反応が 8.5 ~ 9.5、2 - ブタノンの還元反応が 5.5 ~ 6.5 であった。

40

【 0 0 5 7 】

【 実施例 3 】 (2 級アルコール脱水素酵素の作用至適温度)

2 級アルコール脱水素酵素活性を標準反応条件のうち温度だけを変化させて測定した表 2 に示した。至適温度は 50 であった。

【 0 0 5 8 】

【表 2】

50

温度 (°C)	30	37	45	50	55	60
相対活性 (%)	55	65	92	100	88	0

【実施例4】(2級アルコール脱水素酵素のpH安定性)

トリス-塩酸緩衝液pH8.0-9.0、ブリットン-ロビンソン緩衝液pH5.0-12.0中で30、30分間処理後の残存活性を測定し図4に示した。pH8.0~10.0において最も安定であった。

【0059】

10

【実施例5】(2級アルコール脱水素酵素の耐熱性)

2級アルコール脱水素酵素をpH8.0で10分間放置した後、残存活性を測定し図5に示した。40、10分間の熱処理後でも90%以上の残存活性を有していた。

【0060】

【実施例6】(2級アルコール脱水素酵素の基質特異性)

2級アルコール脱水素酵素を種々のアルコール、アルデヒドと反応し、その酸化、還元反応の活性を(S)-2-ブタノールの酸化、2-ブタノンの還元をそれぞれ100とした相対活性で表し、表3及び表4に示した。

【0061】

【表3】

20

	基 質	基質濃度 (mM)	補酵素	相対活性
酸 化	2-プロパノール	100	NAD ⁺	60.0
	(S)-2-ブタノール	50	NAD ⁺	100.0
	(R)-2-ブタノール	50	NAD ⁺	3.3
	(RS)-2-ブタノール	100	NAD ⁺	43.5
	2-ペンタノール	100	NAD ⁺	34.0
	3-ペンタノール	100	NAD ⁺	10.4
	2-ヘキサノール	50	NAD ⁺	27.7
	(S)-2-オクタノール	5	NAD ⁺	67.7
	(R)-2-オクタノール	5	NAD ⁺	0.0
	(RS)-2-オクタノール	5	NAD ⁺	39.2
反 応	シクロヘキサノール	20	NAD ⁺	52.8
	(S)-1-フェニルエタノール	50	NAD ⁺	89.3
	(R)-1-フェニルエタノール	50	NAD ⁺	1.1
	(S)-1,3-ブタンジオール	50	NAD ⁺	17.8
	(R)-1,3-ブタンジオール	50	NAD ⁺	0.3
	2,4-ペンタンジオール	100	NAD ⁺	42.6
	(2R,4R)-2,4-ペンタンジオール	50	NAD ⁺	0.1
	4-メチル-2-ペンタノール	20	NAD ⁺	40.8
(S)-1-アミノ-2-プロパノール	50	NAD ⁺	3.2	
(R)-1-アミノ-2-プロパノール	50	NAD ⁺	7.9	

30

40

【表4】

	基 質	基質濃度 (mM)	補酵素	相対活性
酸 化 反 応	(RS)-2-ヒドロキシ酸	100	NAD ⁺	0.3
	メタノール	100	NAD ⁺	0.2
	エタノール	100	NAD ⁺	1.0
	アリルアルコール	100	NAD ⁺	2.4
	1-プロパノール	100	NAD ⁺	1.5
	1-ブタノール	100	NAD ⁺	2.3
	1-ペンタノール	100	NAD ⁺	1.2
	(S)-1,2-プロパンジオール	50	NAD ⁺	2.5
	(R)-1,2-プロパンジオール	50	NAD ⁺	2.0
還 元 反 応	2-ブタノン	100	NADH	100.0
	アセトン	100	NADH	123.4
	アセトフェノン	20	NADH	121.8
	プロピオンアルデヒド	100	NADH	76.2
	4-ヒドロキシ-2-ブタノン	100	NADH	41.2
	3-ヒドロキシ-3-メチル-2-ブタノン	100	NADH	18.5

【実施例7】(2級アルコール脱水素酵素の阻害剤に対する挙動)

2級アルコール脱水素酵素を種々の試薬中で30、30分間処理し、処理後の活性を、未処理の活性を100とした残存活性で表し、表5に示した。

【0062】

【表5】

阻害剤	濃度 (mM)	相対活性
フェニルメタンスルホニルホルオリド	1	69.0
パラクロロ水銀安息香酸	0.05	0.0
N-メチルマレイミド	1	21.2
ヨード酢酸	1	52.0
エチレンジアミン四酢酸	1	102.5
o-フェナントロリン	1	19.0
HgCl ₂	1	0.0
CuSO ₄	1	25.5
ZnCl ₂	1	16.4
ジチオスレイトール	1	0.0
β-メルカプトエタノール	1	3.2
NH ₂ OH	0.01	92.7
NaN ₃	0.02(%)	89.9
クロトン酸	50	89.6

酵素活性は、ジチオスレイトール(DTT)、ヨードアセトアミド、パラクロロ水銀安息香酸、塩化水銀、塩化亜鉛、高濃度の金属キレーター、2-メルカプトエタノールによって顕著に阻害された。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 3 】

[実施例 8] (2 級アルコール脱水素酵素の部分アミノ酸配列の解析)

精製した 2 級アルコール脱水素酵素 0.153mg を 50mM トリス - 塩酸 pH9.0, 4M 尿素中において 0.53 μ g のリジルエンドペプチダーゼで 30 , 6 時間消化した。切断されたペプチド断片を逆相 H P L C (東ソー製 TSK ODS-120T カラム) を用い、0.1% トリフルオロ酢酸中におけるアセトニトリルの勾配溶出により分離し、分取した。

【 0 0 6 4 】

分取したペプチドを A B I 製プロテインシーケンサー 4 7 7 A によりアミノ酸配列を決定した。

【 0 0 6 5 】

プロテインシーケンサーによって決定されたアミノ酸配列は、図 6、7、8 のアミノ酸配列にアンダーラインで示した。

【 0 0 6 6 】

[実施例 9] (2 級アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子の P C R クローニング)

2 級アルコール脱水素酵素の N 末端に近い部分のアミノ酸配列から予想される D N A 配列を縮重を考慮して合成し混合 P C R プライマー (CpN) とした。また、C 末端に近い部分のアミノ酸配列から予想される D N A 配列の相補配列をもう一方の混合 P C R プライマー (CpT10) として合成した。これら配列を図 9 に示した。なお、D N A の合成は、A B I 製 D N A シンセサイザー 3 8 1 A により行った。

【 0 0 6 7 】

[実施例 1 0] (キャンディダ・パラプシロシスからの染色体 D N A の調製)

キャンディダ・パラプシロシス IF0 1396 を Y E P D 培地 (1 % 酵母エキス、2 % ポリペプトン、2 % グルコース) 100mL 中で培養し、遠心分離により菌体を回収した。菌体を 2 5mL の 1M ソルビトール、0.1M エチレンジアミン 4 酢酸 (E D T A) に懸濁し、再度遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体を 10mL の 50mM リン酸カリウム緩衝液 pH7.5, 1M ソルビトール、0.1M 2-メルカプトエタノールで懸濁し、更に、2.5mg/mL チモリアーゼを 0.4mL 添加し、30 でインキュベートすることによりプロトプラストを形成した。検鏡によりプロトプラスト形成を確認後、遠心分離により菌体を回収した。回収した菌体を、12mL の 50mM トリス - 塩酸 pH7.4, 20mM EDTA に懸濁し、更に、1.2mL の 10% SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を添加後よく混合した。この状態で 65 , 30 分間インキュベートした後、3.6mL の 5M 酢酸カリウム pH5.0 を添加し、氷上で 60 分間放置し、タンパク質を変性沈殿させた。

【 0 0 6 8 】

遠心分離により変性タンパク質を分離し、上清を回収後、等量のイソプロパノールを室温で添加し、ゆっくりと混合した。遠心分離により沈殿した D N A を回収し、乾燥後、15mL の 10mM トリス - 塩酸緩衝液 pH7.4, 1mM EDTA に溶解し、1mg/mL RNase (リボヌクレアーゼ) 0.75mL を添加し、37 , 1 時間インキュベートし、夾雑する R N A を分解した。R N A 分解後、フェノール抽出、フェノール / クロロホルム抽出、クロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿により D N A を回収し、実施例 1 1 における P C R 反応の鋳型 D N A とした。

【 0 0 6 9 】

[実施例 1 1] (2 級アルコール脱水素酵素遺伝子の P C R 法によるクローニング)

実施例 9 において合成した 2 種類の混合 P C R プライマー (CpN 及び CpT10) 100pmol, 実施例 1 0 において調製したキャンディダ・パラプシロシス染色体 D N A 50ng を含む P C R 用緩衝液 (10mM トリス - 塩酸緩衝液 pH8.3, 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム, 各 0.2mM dNTP, 0.01% ゼラチン, 2U Taq D N A ポリメラーゼ (ロシュ社製)) を調製し、熱変性 (94 , 30 秒)、アニーリング (45 , 30 秒)、伸長反応 (60 , 2 分) を 30 サイクル行い、4 まで冷却後、アガロースゲル電気泳動により増幅 D N A を確認した。

【 0 0 7 0 】

10

20

30

40

50

【実施例 12】(PCR法によって増幅したDNAのサブクローニング)

実施例 11においてPCR法により増幅されたDNAを SureClone Ligation Kit (ファルマシア社製)により pUC18 にサブクローニングし、その塩基配列をABI製DNAシーケンサー 373Aにより決定した結果、PCRプライマー配列を含めて971塩基からなっていた。その配列は図6、7、8に示したDNAのうち、プライマー CpN 及びCpT10間に当たる部分である。以後この配列を「コア配列」と記す。

【0071】

【実施例 13】(逆PCR法によるコア配列周辺配列のクローニング)

コア配列の5'-側に近い部分の相補配列 CAATTGACCCGCTTTGGGC (CPA-MUN)、及び、3'-側に近い部分の配列 TTCGAATCTGGGATGTTTTT (CPA-NSP)を化学合成した。2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAにおける合成した逆PCRプライマーの位置を図6、7、8に示した。

【0072】

逆PCRのDNA鑄型として、まず、キャンディダ・パラブシロシスの染色体DNAを制限酵素 HaeII により消化し、消化物をT4DNAリガーゼを用いて自己環化した。この自己環化物50ng、化学合成したプライマー CPA-MUN 及び CPA-NSP をそれぞれ20pmol含むPCR用緩衝液(実施例11に記載のもの)を用い、熱変性(94℃, 30秒)、アニーリング(50℃, 30秒)、伸長反応(70℃, 2分)のサイクルを30回行った。増幅されたDNA断片を実施例12と同様に SureClone Ligation Kit (ファルマシア社製)を用いて pUC18 にサブクローニングし、ABI製DNAシーケンサー 373Aにより全塩基配列を決定した。

【0073】

PCR及び逆PCRにより得られた2級アルコール脱水素酵素をコードするDNAの全塩基配列及び該DNAがコードするアミノ酸配列を図6、7、8にまとめた。

【0074】

【実施例 14】(2級アルコール脱水素酵素をコードする遺伝子のPCR法を用いた合成)

まず、プライマーを用いてPCR法により制限酵素部位の導入を行った。実施例10において得たDNAを鑄型とし、プライマーとしては、EcoRIの制限酵素部位を含む5'-プライマー「CPA-ATG」(5'-TCGCGAATTCAATGTCAATCCATCAAGCCAG-3')とBglII部位を含む3'-プライマー「CPA-TAG」(5'-AGATCTTACTATGGATTAACCAACTCTA-3')により約1030bpのDNA断片をPCR法により増幅し、遺伝子断片を得た。DNAの合成は、ABI社製DNAシンセサイザー 381Aにより行い、PCR反応は実施例11と同様に行った。

【0075】

【実施例 15】(PCR法によって増幅したDNAのサブクローニング)

実施例 14により増幅されたPCR断片を SureClone Ligation Kit (ファルマシア社製)にてプラスミドpUC18マルチクローニングサイトのSmaI部位に連結した(図10)。構築されたプラスミド(pCPA6R)は、ラクトースプロモーター(図中「lacZ」で示す部分に含まれる)とは逆向きに挿入されていた。

【0076】

【実施例 16】(2級アルコール脱水素酵素遺伝子発現プラスミドpKK-CPA1の構築)

さらに、2級アルコール脱水素酵素を発現ベクターpKK223-3(ファルマシイ社製)にサブクローニングし、pKK-CPA1を構築した。pKK-CPA1の構築方法は以下の通りである。pCPA6RをEcoI(プロメガ社製)消化し、HindIIIリンカー(タカラ社製)を連結した上でEcoRI(タカラ社製)およびHindIII(タカラ社製)で切断後、2級アルコール脱水素酵素を有する断片を抽出し、発現ベクターpKK223-3を制限酵素EcoRIおよびHindIIIで切断したものと連結することにより、2級アルコール脱水素酵素遺伝子発現ベクターpKK-CPA1を構

10

20

30

40

50

築した(図11)。

【0077】

[実施例17] (2級アルコール脱水素酵素の生産)

イシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) JM109 のコンピテントセルを調製し、発現ベクター pKK-CPA1 で形質転換することにより、2級アルコール脱水素酵素生産菌株を作成した。この菌株を、0.1mg/mlの濃度でアンピシリンを添加したLB培地(1.0%ポリペプトン、0.5%酵母エキス、1.0%塩化ナトリウム、pH7.2)中で30、3時間培養した。最終濃度1mMとなるようにイソプロピルチオガラクトシド (IPTG) を加えてさらに5時間培養し、培養液を遠心分離し、集菌した。

【0078】

[実施例18] (酵素反応での活性評価)

実施例17に従って調製した菌体を50mM Tris-HCl pH9.0、0.01%2-メルカプトエタノールに懸濁し、超音波粉砕して粗酵素溶液を得た。該酵素液を50mM トリス塩酸緩衝液 pH9.0、50mM(S)-1,3-ブタンジオール、2.5mM NAD⁺ から成る30の反応液に加え、NAD⁺の増加に伴う340nmの吸光度を測定することで(S)-1,3-ブタンジオール酸化活性を測定した。結果を表6に示す。なお、対照として、発現プラスミド pKK-CPA1 で形質転換していない宿主イシェリヒア・コリを用い、実施例18と同様に行った結果を表6に同時に示す。

【0079】

【表6】

菌株名	比活性 (Unit/mg)
イシェリヒア・コリ JM109 (pKK-CPA1)	0.581
イシェリヒア・コリ JM109	0.0

[実施例19] (遺伝子組換え菌体による(R)-1,3-ブタンジオールの生産)

実施例17に従って調製した菌体に最終濃度5%となるようラセミ1,3-ブタンジオールと0.8%炭酸カルシウム水を加え、直径21mm試験管にて30、250rpmで17時間振とう反応させた。なお、反応開始時における菌体濃度を660nmにおけるODが2.0となるようにした。反応終了後、遠心分離にて除菌し、得られた上澄液500μlを塩化ナトリウムで飽和させた後、酢酸エチル2mlを用いて残存する1,3-ブタンジオールを抽出した。抽出液を脱溶媒後、残渣に塩化アセチル100μlを加えて、アセチル化した。これに1ml n-ヘキサンを加えてアセチル化した1,3-ブタンジオールを溶解し、光学分割カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー [カラム: キラルセルOB (ダイセル化学工業株式会社製)、溶媒: n-ヘキサン/2-プロパノール=19:1、波長220nm、流速1.0ml/分、温度40]にて光学純度を測定した(保持時間: (S)体15分、(R)体19.3分)。また、先の上澄液を蒸留水にて適宜希釈した後、ガスクロマトグラフィー [カラム: Thermon 3000 5% / chromosorb W 80~100メッシュ(内径3mm×長さ2.1m)(信和化工株式会社製)、温度130]にて1,3-ブタンジオール濃度を定量した。得られた1,3-ブタンジオールの光学純度、収率を表7に示す。なお、対照として、発現プラスミド pKK-CPA1 で形質転換していない宿主イシェリヒア・コリを用い、実施例19と同様に行った結果を表7に同時に示す。なお、表7中で、収率とは「最初に添加したラセミ1,3-ブタンジオールに対する、反応終了後残存した1,3-ブタンジオールのモル比」を表す。

【0080】

【表7】

10

20

30

40

50

菌株名	光学純度(%)	収率(%)
イシェリヒア・コリ JM109 (pKK-CPA1)	93.2	48.3
イシェリヒア・コリ JM109	0.0	88.8

10

【0081】

【発明の効果】

本発明により、新規な、立体特異性を有する2級アルコール脱水素酵素、該酵素をコードするDNA、該酵素をコードするDNAにより形質転換された微生物を得ることが可能になった。

【0082】

本酵素又は本酵素を産生する微生物(変異株や形質転換微生物を含む)もしくはその処理物を用いることにより、ラセミ体アルコールからの光学活性アルコールの製造、非対称ケトンからの光学活性アルコールの製造などを効率的に行うことが可能となった。

20

【0083】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Daicel Chemical Industries, Co., Ltd.
 <120> New enzyme, method for producing the same, DNA encoding the same, transformed organism having this DNA and method for optically active alcohol production using the same.
 <130> A11-10
 <160> 2
 <210> 1
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Candida parapsilosis
 <400> 1
 atgtcaattc catcaagcca gtacggattc gtattcaata agcaatcagg acttaatctg 60
 agaaatgatt tgcctgtcca caagcccaaa gcgggtcaat tgttggtgaa agttgatgct 120
 gttggattgt gtcattctga ttacatgtc atttacgaag gtttgattg tggtgataat 180
 tatgtcatgg gacatgaaat tgctggaact gttgctgctg tgggtgatga tgcattaac 240
 tacaaggttg gtgatcgtgt tgcctgtgtc ggaccaatg gatgtggtgg gtgcaagtat 300
 tgtcgtggtg ccattgacaa tgtatgtaaa aacgcatttg gtgattggtt cggattgggg 360
 tacgatggtg ggtatcaaca gtacttggtg gttactagac cagtaactt gtctcgtatc 420
 ccagataacg tatctgcaga cgtggctgcg gcttcaactg atgctgtatt gacaccatat 480
 cagcaatca agatggctca agtgtcacca acttogaata tcttgcttat tggctctggt 540
 ggattgggtg gaaatgcaat tcaagttgcc aaggcatttg gtgcgaaagt tactgttttg 600
 gacaaaaaaaa aggaggctcg tgaccaagca aagaagttgg gtgctgatgc agtttatgaa 660
 acattgccag aatccatttc tctggtctt tttcagcat gttttgattt tgtttcagt 720
 caagctacat ttgatgtatg tcaaaagtat gttgaaccaa aggggtgtaat tatgcccgtg 780
 ggactcgtg ctcctaattt atcgtttaat ttgggagatt tggcattgag agaaattcga 840
 atcttgggta gtttttgggg aactactaat gatttggatg atgttttgaa attggttagt 900
 gaaggtaaag ttaaacccgt tgtgagaagt gccaaattga aggaattgcc agagtatatt 960
 gaaaaattga gaaacaatgc ttatgaaggt agagttgttt ttaatccata g 1011

30

40

50

<210> 2
 <211> 336
 <212> PRT
 <213> Candida parapsilosis
 <400> 2
 Met Ser Ile Pro Ser Ser Gln Tyr Gly Phe Val Phe Asn Lys Gln Ser
 1 5 10 15
 Gly Leu Asn Leu Arg Asn Asp Leu Pro Val His Lys Pro Lys Ala Gly
 20 25 30
 Gln Leu Leu Leu Lys Val Asp Ala Val Gly Leu Cys His Ser Asp Leu
 35 40 45
 His Val Ile Tyr Glu Gly Leu Asp Cys Gly Asp Asn Tyr Val Met Gly
 50 55 60
 His Glu Ile Ala Gly Thr Val Ala Ala Val Gly Asp Asp Val Ile Asn
 65 70 75
 Tyr Lys Val Gly Asp Arg Val Ala Cys Val Gly Pro Asn Gly Cys Gly
 85 90 95
 Gly Cys Lys Tyr Cys Arg Gly Ala Ile Asp Asn Val Cys Lys Asn Ala
 100 105 110
 Phe Gly Asp Trp Phe Gly Leu Gly Tyr Asp Gly Gly Tyr Gln Gln Tyr
 115 120 125
 Leu Leu Val Thr Arg Pro Arg Asn Leu Ser Arg Ile Pro Asp Asn Val
 130 135 140
 Ser Ala Asp Val Ala Ala Ser Thr Asp Ala Val Leu Thr Pro Tyr
 145 150 155 160
 His Ala Ile Lys Met Ala Gln Val Ser Pro Thr Ser Asn Ile Leu Leu
 165 170 175
 Ile Gly Ala Gly Gly Leu Gly Gly Asn Ala Ile Gln Val Ala Lys Ala
 180 185 190
 Phe Gly Ala Lys Val Thr Val Leu Asp Lys Lys Lys Glu Ala Arg Asp
 195 200 205
 Gln Ala Lys Lys Leu Gly Ala Asp Ala Val Tyr Glu Thr Leu Pro Glu
 210 215 220
 Ser Ile Ser Pro Gly Ser Phe Ser Ala Cys Phe Asp Phe Val Ser Val
 225 230 235 240
 Gln Ala Thr Phe Asp Val Cys Gln Lys Tyr Val Glu Pro Lys Gly Val
 245 250 255
 Ile Met Pro Val Gly Leu Gly Ala Pro Asn Leu Ser Phe Asn Leu Gly
 260 265 270
 Asp Leu Ala Leu Arg Glu Ile Arg Ile Leu Gly Ser Phe Trp Gly Thr
 275 280 285
 Thr Asn Asp Leu Asp Asp Val Leu Lys Leu Val Ser Glu Gly Lys Val
 290 295 300
 Lys Pro Val Val Arg Ser Ala Lys Leu Lys Glu Leu Pro Glu Tyr Ile
 305 310 315 320
 Glu Lys Leu Arg Asn Asn Ala Tyr Glu Gly Arg Val Val Phe Asn Pro
 325 330 335

10

20

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】精製した 2 級アルコール脱水素酵素のドデシル硫酸ナトリウム - ポリアクリルアミドゲル電気泳動におけるパターンを示す図である。

【図 2】2 級アルコール脱水素酵素の (S) - 2 - ブタノール酸化反応の pH 依存性を至適 pH を 10.0 とした相対活性で示す図である。

【図 3】2 級アルコール脱水素酵素の 2 - ブタノン還元反応の pH 依存性を至適 pH における活性を 100 とした相対活性で示す図である。

【図 4】2 級アルコール脱水素酵素を各 pH において 30、30 分処理した後の残存活性を示す図である。

40

【図 5】2 級アルコール脱水素酵素を各温度で 10 分処理した後の残存活性を示す図である。

【図 6】2 級アルコール脱水素酵素をコードする DNA の塩基配列、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列、PCR プライマー及び逆 PCR プライマーの部位を示す図である。

【図 7】2 級アルコール脱水素酵素をコードする DNA の塩基配列、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列、PCR プライマー及び逆 PCR プライマーの部位を示す図である。

【図 8】2 級アルコール脱水素酵素をコードする DNA の塩基配列、該塩基配列から予想されるアミノ酸配列、PCR プライマー及び逆 PCR プライマーの部位を示す図である。

【図 9】PCR 用混合プライマー CpN、CpT10 の構造を示す図である。なお、図中同一部位に複数の塩基が記載してあるものは、混合プライマーがそれら複数の塩基を有す

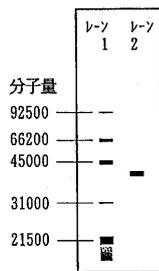
50

るプライマーの混合物になっていることを示す。

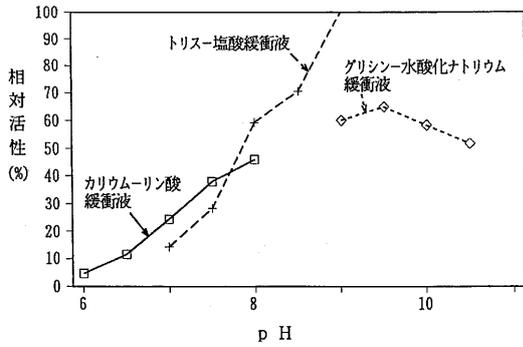
【図10】プラスミド pCPA6R の構成を示す図である。

【図11】発現ベクター pKK-CPA1 の構成を示す図である。

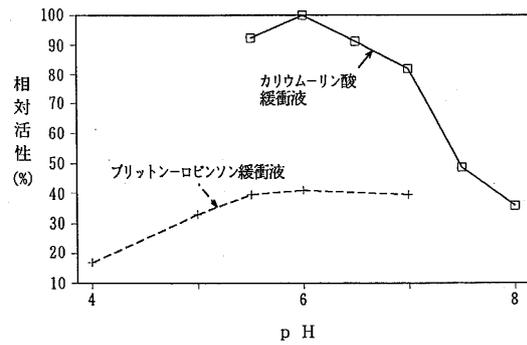
【図1】



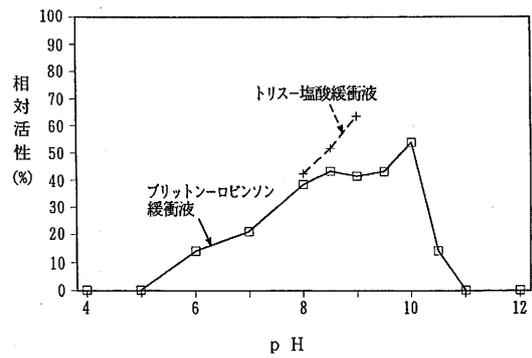
【図2】



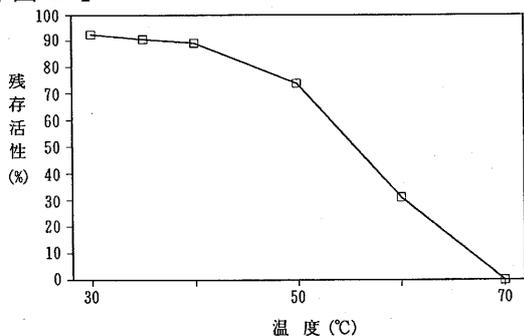
【図3】



【図4】



【 図 5 】



【 図 6 】

2級アルコール脱水素酵素をコードするDNA

10 20 30 40 50 60
 ATGTCAAATCCATCAACCCAGTACGGATTCCGATTCAATAACCAATCAGCACTTAATCTC
MetSerIleProSerSerGlnTyrGlyPheValPheAsnLysGlnSerGlyLeuAsnLeu

CpN →

70 80 90 100 110 120
 AGAAATGATTGCCTGCCACAACCCAAACCGGTCATCTGTTGAAAGTTGATGCT
ArgAsnAspLeuProValHisLysProLysAlaGlyGlnLeuLeuLysValAspAla

← CPA-MUN

130 140 150 160 170 180
 GTTGGATTGCTCATTCTGATTACATGTCATTTACGAAGGTTGATTGGTGATAAT
ValGlyLeuCysHisSerAspLeuHisValIleTyrGluGlyLeuAspCysGlyAspAsn

190 200 210 220 230 240
 TATGTCATGGGACATGAAATTCGGAACCTGTTGCTGCTGGGTGATGATGATTAAC
TyrValMetGlyHisGluIleAlaGlyThrValAlaAlaValGlyAspAspValIleAsn

250 260 270 280 290 300
 TACAAGCTTGGTATCGTGTCCCTGTGTCGGACCAATCGATGCTGGTGCAGAT
TyrLysValGlyAspArgValAlaCysValGlyProAsnGlyCysGlyCysLysTyr

310 320 330 340 350 360
 TGTCTGGTGCATTGACAATGTATGTAACACGCAATTTGGTATTGCTCCGATTGGCG
CysArgGlyAlaIleAspAsnValCysLysAsnAlaPheGlyAspTrpPheGlyLeuGly

【 図 7 】

370 380 390 400 410 420
 TACGATGGTGGGATCAACAGTACTTGTGGTTACTAGACCACGTAACCTGCTCGTATC
TyrAspGlyGlyTyrGlnGlnTyrLeuLeuValThrArgProArgAsnLeuSerArgIle

430 440 450 460 470 480
 CCAGATAACGTATCTGCAGACGTGGCTGCGGCTCAACTGATGCTGTATTGACACCATAT
ProAspAsnValSerAlaAspValAlaAlaAlaSerThrAspAlaValLeuThrProTyr

490 500 510 520 530 540
 CACGCAATCAAGATGGCTCAAGTGTCAACCAACTTCGAATATCTGCTATTGGTCTGCT
HisAlaIleLysMetAlaGlnValSerProThrSerAsnIleLeuLeuIleGlyAlaGly

550 560 570 580 590 600
 GGATTGGGTGGAAATGCAATTCAAGTTGCCAAGGCAATTTGCTCCGAAAGTTACTGTTTTG
GlyLeuGlyGlyAsnAlaIleGlnValAlaLysAlaPheGlyAlaLysValThrValLeu

610 620 630 640 650 660
 GACAAAAAAGGAGGCTCGTACCAAGCAAAAGAACTGGGTGCTGATGCAGTTTATGAA
AspLysLysLysGluAlaArgAspGlnAlaLysLysLeuGlyAlaAspAlaValTyrGlu

670 680 690 700 710 720
 ACATTGCCAGAAATCCATTTCTCGCTGCTTTTTCAGCATGTTTGGATTTGTTTCAGTG
ThrLeuProGluSerIleSerProGlySerPheSerAlaCysPheAspPheValSerVal

730 740 750 760 770 780
 CAAGCTACATTTGATGATGTATGCAAAAGTATGTTGAACCAAGGGTGTAAATATGCCCGTG
GlnAlaThrPheAspValCysGlnLysTyrValGluProLysGlyValIleMetProVal

【 図 8 】

790 800 810 820 830 840
 GGACTCGGTGCTCCTAATTTATCGTTAATTTGGGAGATTTGGCATTGACAGAAATTCGA
GlyLeuGlyAlaProAsnLeuSerPheAsnLeuGlyAspLeuAlaLeuArgGluIleArg

CPA-NSP →

850 860 870 880 890 900
 ATCTTGGGTAGTTTTTGGGAACTACTAATGATTTGGATGATGTTTGAATTGGTTAGT
IleLeuGlySerPheTrpGlyThrThrAsnAspLeuAspAspValLeuLysLeuValSer

910 920 930 940 950 960
 GAAGTAAAGTTAAACCCGTTGTGAGAAGTGCCAAATGAAGAAATGCCAGAGTATATT
GluGlyLysValLysProValValArgSerAlaLysLeuLysGluLeuProGluTyrIle

970 980 990 1000 1010
 GAAAAATTGAGAAACAATGCTTATGAAGGTAGAGTTGTTTTAATCCATAG
GluLysLeuArgAsnAsnAlaTyrGluGlyArgValValPheAsnPro***

← CpT10

【 図 9 】

混合プライマー CpN、CpT10の塩基配列

(CpN)

アミノ酸配列: Tyr-Gly-Phe-Val-Phe-Asn-Lys-Gln

DNA配列 : 5' TAT-GGT-TTT-GTT-TTT-AAT-AAA-CA 3'

(CpN)	C	C	C	C	C	C	G
	A		A				
	G		G				

(CpT10)

アミノ酸配列: Asn-Asn-Ala-Tyr-Glu-Gly-Arg

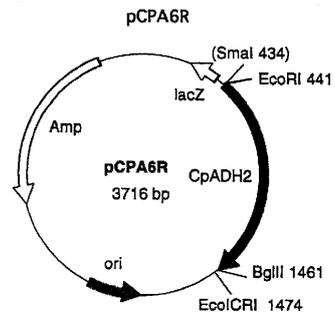
DNA配列 : 5' AAT-AAT-GCT-TAT-GAA-GGT-CG 3'

	C	C	C	C	G	C	A
	A		A				
	G		G				

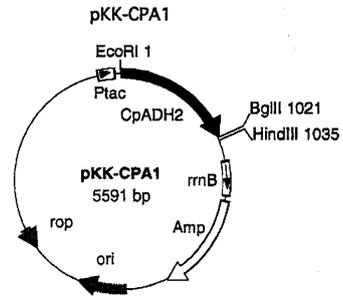
相補配列 : 3' TTA-TTA-CCA-ATA-CTT-CCA-GC 5'

(CpT10)	G	G	G	G	C	G	T
	T		T				
	C		C				

【 図 10 】



【 図 11 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷		F I	
C 1 2 N 9/04		C 1 2 P 7/26	
C 1 2 P 7/26		C 1 2 P 41/00	C
C 1 2 P 41/00		C 1 2 N 5/00	A
//(C 1 2 N 9/04		C 1 2 N 15/00	Z N A A
C 1 2 R 1:72)		C 1 2 R 1:72	
(C 1 2 N 15/09		C 1 2 N 9/04	E
C 1 2 R 1:72)		C 1 2 R 1:72	

(72)発明者 松山 章収
新潟県新井市中川125-1-104

審査官 佐久 敬

(56)参考文献 国際公開第93/018138(WO, A1)
J.Biol.Chem., April 15 1993, Vol.268, No.11, p.7792-7798
J.Biol.Chem., 1982, Vol.257, No.6, p.3018-3025
J.Biol.Chem., 1978, Vol.253, No.23, p.8414-8419

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, D B名)

C12N 15/00-15/90
C12N 9/00- 9/99
C12P 1/00-41/00
PubMed
BIOSIS/WPI(DIALOG)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
JSTPlusファイル(JOIS)