

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年9月7日(07.09.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/117999 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12P 7/40* (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/054731
- (22) 国際出願日: 2012年2月27日(27.02.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2011-043085 2011年2月28日(28.02.2011) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人慶應義塾(KEIO UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田二丁目15番45号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 宮本 憲二 (MIYAMOTO Kenji) [JP/JP]; 〒2238522 神奈川県横浜市港北区日吉三丁目14番1号 慶應義塾大学理工学部内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 規則 4.17 に規定する申立て:
— 不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て (規則 4.17(v))
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: (S)-SELECTIVE HYPERACTIVE MUTANT ARYLMALONATE DECARBOXYLASE

(54) 発明の名称: S体選択の高活性型変異型アリアルマロン脱炭酸酵素

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a mutant arylmalonate decarboxylase of (S)-selective hyperactive form which is capable of producing (S)- α -arylpropionic acid with an optical purity of almost 100%e.e. from arylmalonic acid. The mutant arylmalonate decarboxylase of (S)-selective hyperactive form, which is capable of producing (S)- α -arylpropionic acid from arylmalonic acid, has mutation (i), mutations (i) and (ii), mutations (i) and (iii), or mutations (i), (ii) and (iii) in the amino acid sequence of wild-type arylmalonate decarboxylase that is represented by SEQ ID NO:2: (i) substitution of glycine at 74 position by cysteine, and substitution of cysteine at 188 position by glycine; (ii) substitution of tyrosine at 48 position by another amino acid; and (iii) substitution of methionine at 159 position by another amino acid.

(57) 要約: 本発明は、S体選択の高活性型の変異型アリアルマロン脱炭酸酵素であって、アリアルマロン酸からほぼ100%e.e.の光学純度のS体の α -アリアルプロピオン酸を生成する酵素の提供を目的とする以下の発明である。アリアルマロン酸からS体の α -アリアルプロピオン酸を生成し得る、配列番号2に示される野生型のアリアルマロン脱炭酸酵素のアミノ酸配列において以下の(i)の変異、(i)及び(ii)の変異、(i)及び(iii)の変異、又は(i)、(ii)及び(iii)の変異を有する、S体選択の高活性型の変異型アリアルマロン脱炭酸酵素: (i) 第74番目のグリシンのシステインへの置換、及び第188番目のシステインのグリシンへの置換; (ii) 第48番目のチロシンの他のアミノ酸への置換; (iii) 第159番目のメチオニンの他のアミノ酸への置換。



WO 2012/117999 A1

明 細 書

発明の名称：S体選択的高活性型変異型アリールマロン脱炭酸酵素 技術分野

[0001] 本発明は、S体選択的な高活性型変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素に関し、該酵素はアリールマロン酸からS体の α -アリールプロピオン酸を生成する。

背景技術

[0002] アリールマロン酸脱炭酸酵素 (AMDase、EC 4.1.1.76) は、アリールマロン酸の脱炭酸反応を触媒しR体のカルボン酸誘導体 (α -アリールプロピオン酸誘導体：プロフェン類) を生成する酵素であり、*Alcaligenes bronchisepticus* KU1201株より単離された240アミノ酸(推定分子量24,734 Da)のモノマー酵素である(非特許文献1)。

[0003] 野生型のアリールマロン酸が、R体の α -アリールプロピオン酸のみを生成するが、S体の α -アリールプロピオン酸及びその誘導体は、非ステロイド系抗炎症薬、液晶素材、殺虫剤、除草剤やその中間体として重要な化合物群である。

[0004] アリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列において、74番目のグリシンをシステインに置換し、かつ188番目のシステインをセリンに置換した2重変異を導入した変異体 (G74C/C188S)は、S体の α -アリールプロピオン酸を生成するようになることが報告されている。しかしながら、その変異体の活性は、野生型酵素の1万分の1程度と非常に低く、実用的ではなかった(非特許文献2及び3)。

[0005] さらに、上記2重変異体 (G74C/C188S)に対してランダム変異導入を行い得られた3重変異体 (S36N/G74C/C188S)は、上記2重変異体に対して約10倍高い活性を有していた。しかしながら、それでも野生型酵素に比較すると1%以下の活性を有しているに過ぎず、依然として実用的ではなかった(非特許文献4)。

先行技術文献

非特許文献

- [0006] 非特許文献1 : Miyamoto et al., Eur.J.Biochem., 1992, 10, 475-481
非特許文献2 : Terao et al., J Mol Catat B: Enzym, 2007, 15-20
非特許文献3 : Iijima et al., Chemical Communications (Cambridge, United Kingdom), 2005, 7, 877-879.
非特許文献4 : Terao et al., Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 73, 647-653

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0007] 本発明は、変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素であって、アリールマロン酸からほぼ100%e. e. の光学純度のS体の α -アリールプロピオン酸を高活性で生成する酵素、及び該酵素を用いたS体の α -アリールプロピオン酸を製造する方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

- [0008] 本発明者らはすでに、野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素 (AMDase) にG74C/C188Sの変異を導入することにより、エナンチオ選択性の逆転に成功し基質であるアリールマロン酸誘導体よりS体の α -アリールプロピオン酸を生成させることに成功していた。しかしながら、その活性は野生型と比較して激減しており、工業利用するために十分な活性を有していなかった。
- [0009] 本発明者らは、Directed evolution(進化分子工学的手法)により、G74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の活性を向上させようと考えた。ここでいうDirected evolutionとは、(1) 目的タンパク質の遺伝子に変異を導入したライブラリーを作成し、(2) このライブラリーから目的の性質を持つ変異体を選抜し、(3) 選抜された変異体の遺伝子をシーケンシングし、さらに(4) 選抜された変異体の遺伝子から再びライブラリーを作成する、というサイクルを繰り返すことで、あたかも生物の「進化」のように目的タ

ンパク質に変異を繰り返し、最終的に望ましい性質を持ったタンパク質を得る、というタンパク質工学の手法のことである。

[0010] 本発明者らは、最初に野生型アリールマロン酸脱炭酸酵素及びS体選択的なG74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の立体構造をX線結晶構造解析により分析し、触媒活性に関与するアミノ酸残基を特定した。それらのアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素のライブラリーを構築し、Saturation Mutagenesisを行い、変異型酵素の活性を測定した。

[0011] その結果、G74C/M159L/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素及びY48F/G74C/M159L/C188G変異型脱炭酸酵素が、S体選択的なエナンチオ選択性を有しつつ、G74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素に比べ酵素活性が向上していることを見出し、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を得た。

[0012] すなわち、本発明は以下の通りである。

[0013] [1] アリールマロン酸からS体の α -アリールプロピオン酸を生成し得る、配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列において以下の(i)の変異、(i)及び(ii)の変異、(i)及び(iii)の変異、又は(i)、(ii)及び(iii)の変異を有する、S体選択的高活性型の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素：

(i) 第74番目のグリシンのシステインへの置換、及び第188番目のシステインのグリシンへの置換；

(ii) 第48番目のチロシンの他のアミノ酸への置換；

(iii) 第159番目のメチオニンの他のアミノ酸への置換。

[0014] [2] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されているG74C/C188G変異型である、[1]の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。

[0015] [3] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ

酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されているG74C/M159L/C188G変異型である、[1]の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。

[0016] [4] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第48番目のチロシンがフェニルアラニンに置換され、第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されているY48F/G74C/M159L/C188G変異型である、[1]の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。

[0017] [5] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、かつ第188番目のシステインがセリンに置換されているG74C/C188S変異型酵素に比較して、酵素活性が向上している、[1]~[3]のいずれかの変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。

[0018] [6] [1]~[5]のいずれかの変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素をアリールマロン酸誘導体と接触させることを含む、S体の α -アリールプロピオン酸の製造方法。

[0019] [7] S体の α -アリールプロピオン酸がプロフェン類である、[6]の製造方法。

[0020] [8] S体の α -アリールプロピオン酸がイブプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン及びインドプロフェンからなる群から選択される、[7]の製造方法。

[0021] [9] アリールマロン酸からS体の α -アリールプロピオン酸を生成し得る、配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列において以下の(i)及び(ii)の変異を有する、S体選択的高活性型の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素：

(i) 第74番目のグリシンのシステインへの置換、第159番目のメチオニンのシステインへの置換、及び第188番目のシステインのグリシンへの置換；

(iii) 第156番目のメチオニンのイソロイシン又はロイシンへの置換。

[0022] [10] [9]の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素をアリールマロン酸誘導体と接触させることを含む、S体の α -アリールプロピオン酸の製造方法。

[0023] [11] S体の α -アリールプロピオン酸がプロフェン類である、[10]の製造方法。

[0024] [12] S体の α -アリールプロピオン酸がイブプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン及びインドプロフェンからなる群から選択される、[11]の製造方法。

[0025] 本明細書は本願の優先権の基礎である日本国特許出願2011-043085号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

発明の効果

[0026] 本発明のS体選択的高活性型の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素により、アリールマロン酸誘導体の脱炭酸によりS体の α -アリールプロピオン酸をほぼ100%e. e. の高い光学純度で得ることができる。S体の α -アリールプロピオン酸（S型プロフェン）は非ステロイド系抗炎症剤（NSAID）等として利用することができる。

図面の簡単な説明

[0027] [図1]イブプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン、インドプロフェンの構造式を示す図である。

[図2]進化分子工学的手法(direct evolution)により、G74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の活性を向上させるためのスキームを示す図である。

発明を実施するための形態

[0028] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0029] 本発明のS体選択的高活性型の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列において以下の(i)の変異、(i)及び(ii)の変異、(i)及び(iii)の変異、又は(i)、(ii)及び(iii)の変異を有する：

(i) 第74番目のグリシンのシステインへの置換、及び第188番目のシステインのグリシンへの置換；

(ii) 第48番目のチロシンの他のアミノ酸への置換；

(iii) 第159番目のメチオニンの他のアミノ酸への置換。

[0030] (i) の変異により野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素の立体選択性が逆転し、アリールマロン酸誘導体から、S体の α -アリールプロピオン酸を生成するようになる。しかしながら、(i) の変異により、酵素活性は野生型酵素に比べて低下する。(ii) 又は (iii) の変異により、低下した活性が向上する。

[0031] 他のアミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン、グルタミン酸、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、チロシン、リジン及びバリンから野生型酵素のアミノ酸を除いた19種類のアミノ酸から選択される。

[0032] 上記変異中、第48番目のチロシンは好ましくはフェニルアラニンに置換され、第159番目のメチオニンは好ましくはロイシンに置換されている。

[0033] 本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、好ましくは配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されている変異体である。さらに、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、好ましくは配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸のアミノ酸配列の第48番目のチロシンがフェニルアラニンに置換され、第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されている変異体である。本発明において、例えば、第74番目のグリシンのシステインへの変異をG74Cと表し、酵素の変異体を示すときは、G74C変異型酵素という。この表し方によると、上記の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、それぞれG74C/M159L/C188G変異型酵素、

及びY48F/G74C/M159L/C188G変異型酵素という。

[0034] さらに、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、好ましくは配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、第188番目のシステインがグリシンに置換され、かつ第156番目のバリンがイソロイシンに置換されている変異体 (G74C/M159L/C188G/V156I)である。さらに、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、好ましくは配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、第188番目のシステインがグリシンに置換され、かつ第156番目のバリンがロイシンに置換されている変異体 (G74C/M159L/C188G/V156L)である。

[0035] 本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、アリールマロン酸に作用し、 α 位の立体配置がSであるS体の α -アリールプロピオン酸 (プロフェン) を生成する。すなわち、野生型アリールマロン酸脱炭酸酵素の有する立体選択性とは逆の立体選択性を有し、エナンチオ選択性がS体である。アリールマロン酸に作用し、S体の α -アリールプロピオン酸 (プロフェン) を生成する変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素として、従来より、第74番目のグリシンがシステインに置換され、第188番目のシステインがセリンに置換されたG74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素が知られていた (Terao et al., J Mol Catal B: Enzym, 2007, 15-20)。本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、G74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素よりも向上した酵素活性を有する。以下に記載の酵素活性測定法で測定したときの発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素活性は、G74C/C188S変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の5倍以上、好ましくは10倍以上、さらに好ましくは50倍以上、さらに好ましくは100倍以上、特に好ましくは150倍以上である。好ましくは、本発明のG74C/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の酵素活性はG74C/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の約5倍以上高く、本発明のG74C

/M159L/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の酵素活性はG74C/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の約200倍以上高く、本発明のY48F/G74C/M159L/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の酵素活性はG74C/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の約920倍高い。

[0036] また、本発明のG74C/M159L/C188G/V156I変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の基質として α -メチル- α -フェニルマロン酸を用いた場合の酵素活性はG74C/M159L/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の約2倍以上高く、本発明のG74C/M159L/C188G/V156L変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の基質として α -メチル- α -フェニルマロン酸を用いた場合の酵素活性はG74C/M159L/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の約3倍以上高い。

[0037] アリールマロン酸脱炭酸酵素の比活性は、例えば以下の方法で測定することができる。すなわち、pH7~8、数十から数百mMのフェニルマロン酸誘導体水溶液を50 μ L、1M Tris-HCl pH緩衝液を50 μ L、超純水350 μ Lを混ぜ、30°Cで10分以上インキュベートする。これにアリールマロン酸脱炭酸酵素溶液50 μ Lを加え、混合する。反応時間は、基質の変換率が10%以内になるように調節する。これは、酵素反応速度は基質の濃度によって変化するからである。反応終了後逆相HPLC分析する。同様に同じ条件で、酵素溶液の代わりに10mM Tris緩衝液を添加した系において、逆相HPLC分析し、この測定結果をブランクとして、酵素溶液のデータから差し引いた値から、比活性を計算すればよい。

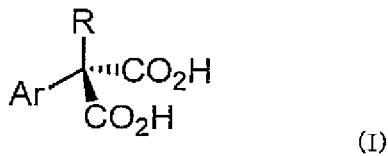
[0038] また、アリールマロン酸脱炭酸酵素の $K_{cat} \cdot K_m$ は、例えば以下の方法で測定することができる。すなわち、基質の終濃度を40、20、10、5、2.5、1.25、0.625mMとした反応系で比活性を測定する。比活性の測定結果をプロットとして、「 $1/[S]-1/v$ plot」(Lineweaver-Burk plot)を引き、 k_{cat} と K_m を決定することができる。

[0039] 本発明の変異型酵素が基質とする化合物はアリールマロン酸誘導体であり、好ましくは α 位にメチル基を有する α -アリール- α -メチルマロン酸誘導体である。例えば、 α -メチル- α -フェニルマロニン酸が挙げられる。変異型

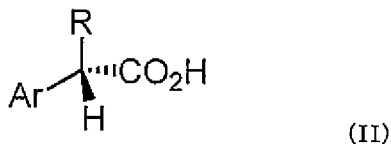
酵素はこれらのアリールマロン酸誘導体に作用してS体の α -アリールプロピオン酸を生成する。

[0040] アリールマロン酸は下記の一般式 (I) で表わされ、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素により下記の一般式 (II) で表わされる α -アリールプロピオン酸が生成する。

[化1]



[化2]



[0041] 式中、Rは、H、CH₃、F、OH、NH₂からなる群から選択され、Arは、無置換又は任意の置換基で置換されているアリール基を示す。置換基として、C1~C6のアルキル基、C1~C6のアルコキシ基、ハロゲン原子、ニトロ基、シアノ基、アミノ基、C1~C6のアルコキシカルボニル基、フェニル基、ヒドロキシ基等が挙げられ、アリール基として、フェニル基、 α -ナフチル基、 β -ナフチル基、2-フリル基、3-フリル基、2-チエニル基、3-チエニル基等が挙げられる。

[0042] 本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を用いて製造されるS体の α -アリールプロピオン酸の光学純度は（鏡像体過剰率）は、99%e.e.以上、好ましくは99.5%e.e.以上、さらに好ましくは99.7%e.e.以上である。

[0043] 鏡像体過剰率は、例えば以下の方法で測定することができる。すなわち、約50 μ molの基質を1.5mLチューブに移し、500 μ Lの超純水に溶解し、2M NaOH超純水と2M HCl超純水を用いてpH8に合わせた。これを1mLにメスアップした後、1M Tris-HCl pH緩衝液を250 μ L加えてvortexした。この溶液を125 μ Lずつ分注し、0~100 μ Lの超純水と25~125 μ Lの酵素液を加えて、30°Cで1週間

程度反応させることで、基質を全て反応させる。この反応液に2M HClを125 μ L加えて反応を停止し、これにジエチルエーテルを300 μ L加えてvortexし、遠心分離(13,000rpm, 2min)した後上清を採取した。この操作を3回繰り返すことで、生成物を抽出する。得られる生成物を、TMSジアゾメタンを少量加えることでメチル化し、ジエチルエーテルを揮発させて、500 μ Lのジエチルエーテル：イソプロパノール=1：1溶液に溶解し、順層HPLC分析を行う。生成物の鏡像異性体のピーク面積から、鏡像体過剰率を測定すればよい。

[0044] 本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素は、上記の変異を有し、上記第48番目、第74番目、第159番目及び第188番目のアミノ酸以外の位置で、さらに1又は数個(例えば1~10個、好ましくは1~5個、さらに好ましくは1~3個、特に好ましくは1個)のアミノ酸が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、アリールマロン酸誘導体の脱炭酸を触媒し、S体の α -アリールプロピオン酸を生成し、G74C/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素よりも上昇した酵素活性を有する変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を包含する。さらに、上記の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列に対して、上記の第48番目、第74番目、第159番目及び第188番目のアミノ酸置換を維持し、90%以上、さらに好ましくは95%以上、特に好ましくは97%以上のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列からなり、アリールマロン酸誘導体の脱炭酸を触媒し、S体の α -アリールプロピオン酸を生成し、G74C/C188G変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素よりも上昇した酵素活性を有する変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を包含する。

[0045] 配列番号2に示されるアミノ酸配列からなる酵素は、*Alcaligenes bronchisepticus* KU1201株(微工研菌寄第11670号)より単離されたアリールマロン酸脱炭酸酵素である。また、配列番号1に該酵素をコードするDNAの塩基配列を示す。上記微生物からアリールマロン酸脱炭酸酵素をコードするDNAを単離し、部位特異的突然変異誘発法等によって上記の変異を導入することによって、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素をコードするDNAを得ることができる。本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素をコードするDNAを適

当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを宿主に導入し、該DNAを含む形質転換体を作製し、該形質転換体を培養することにより、宿主細胞や培養液等の培養物から本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を公知の手法で精製すればよい。

[0046] この際、ベクターとしては、大腸菌由来のプラスミド(例えばpBR322、pBR325、pUC118、pUC119、pUC18、pUC19、pBluescript等)、枯草菌由来のプラスミド(例えばpUB110、pTP5等)、酵母由来のプラスミド(例えばYEp13等のYEp系、YCp50等のYCp系等)等を用いることができ、また入ファージ等のファージDNAを用いることもできる。さらに、レトロウイルス又はワクシニアウイルス等の動物ウイルスやバキュロウイルス等の昆虫ウイルスベクターを用いることもできる。

[0047] 宿主としては、大腸菌、枯草菌等の細菌、酵母等の真菌類、サル細胞COS-7、Vero、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)等の動物細胞、Sf9細胞等の昆虫細胞を用いることができる。

[0048] DNAを挿入したベクターの宿主細胞への導入はエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等により行うことができる。

[0049] 宿主細胞や培養液等の培養物からの本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の精製は、ゲルろ過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等の公知のタンパク質精製法を適宜組み合わせて行うことができる。

[0050] 本発明は、上記の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を用いて、アリールマロン酸からS体の α -アリールプロピオン酸を製造する方法を包含する。原料となるアリールマロン酸は α -アリール- α -メチルマロン酸誘導体であり、マロン酸から公知の方法によりメチル基とアリール基を付加することにより得ることができる。また、ラセミ体の α -アリールプロピオン酸に炭酸付加することによっても得られる。

[0051] アリールマロン酸を本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素と混合し

接触させ酵素反応を行わせることにより、S体の α -アリールプロピオン酸を得ることができる。この際の反応条件は、pH 7～9、4～50°Cで、原料となるアリールマロン酸と変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の量によるが数分～数十時間である。原料となるアリールマロン酸と混合する酵素の量は限定されないが、例えば、アリールマロン酸10mMに対して変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を1～1000U混合すればよい。

[0052] 本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素により、得られるS体の α -アリールプロピオン酸は医薬、液晶原料、農薬等、あるいはその中間体として有用である。特に、非ステロイド性抗炎症薬 (Nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID)) として有用である。これらの α -アリールプロピオン酸はプロフェン類と呼ばれる。

[0053] 例えば、以下のアリールマロン酸から以下の α -アリールプロピオン酸が生成する。

[0054] α -(p-イソブチルフェニル)- α -メチルマロン酸から、(S)- α -(p-イソブチルフェニル)プロピオン酸 (イブプロフェン) が生成し、 α -(6-メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸から(S)- α -(6-メトキシ-2-ナフチル)プロピオン酸 (ナプロキセン) が生成し、 α -(2-フルオロビフェニル-4-イル)- α -メチルマロン酸から(S)- α -(2-フルオロビフェニル-4-イル)プロピオン酸 (フルルビプロフェン) が生成し、 α -(3-フェノキシフェニル)- α -メチルマロン酸から(S)- α -(3-フェノキシフェニル)プロピオン酸 (フェノプロフェン) が生成し、 α -(3-ベンゾイルフェニル)- α -メチルマロン酸から(S)- α -(3-ベンゾイルフェニル)プロピオン酸 (ケトプロフェン) が生成し、 α -{4-[(2-オキシシクロペンチル)メチル]フェニル}- α -メチルマロン酸から(S)- α -{4-[(2-オキシシクロペンチル)メチル]フェニル}プロピオン酸 (ロキソプロフェン) が生成し、 α -[4-(1-オキシ-2-イソインドリニル)フェニル]- α -メチルマロン酸から ((S)- α -[4-(1-オキシ-2-イソインドリニル)フェニル]プロピオン酸 (インドプロフェン) が生成する。上記のイブプロフェン (ibuprofen)、ナプロキセン (naproxen)、フルルビプロフェン (flurbiprofen)、フェノプロ

フェン(fenoprofen)、ケトプロフェン(ketoprofen)、インドプロフェン(indoprofen)の構造式を図1に示す。

[0055] さらに、本発明の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素により、オキサプロフェン、ザルトプロフェン、アルミノプロフェン、ベノキサプロフェン、ベルモプロフェン、カルプロフェン、シクロプロフェン、フルノキサプロフェン、ミクロプロフェン、ピルプロフェン、プラノプロフェン、スプロフェン、キシモプロフェン等のS体のプロフェン類を製造することができる。

[0056] 生成したS体の α -アリールプロピオン酸は、公知のクロマトグラフィー等の手法により精製し、医薬品、農薬、液晶材料あるいはその原料として用いることができる。

実施例

[0057] 本発明を以下の実施例によって具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

[0058] 実施例1 変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の作製及び活性測定

Directed evolution(進化分子工学的手法)により、既に報告されている、アリールマロン酸変異体(G74C/C188S)の活性を向上させることを試みた。

[0059] 最初に、X線結晶構造解析から得られた構造情報等を用いて酵素の触媒反応について解析したところ、アリールマロン酸脱炭酸酵素の触媒反応について以下のことがわかった。

[0060] (1) Ser188とCys74側鎖が、生成物の α 炭素を挟んで向かい合うように位置している。この構造より、生成物中間体のプロキラル面を挟むように、188番目と74番目の残基が位置している、というエナンチオ選択性が発現される。

[0061] (2) Cys74とSer188が、直接基質と相互作用することによって、脱炭酸活性に不利な影響を及ぼす。

[0062] (3) 基質が活性部位に結合すると、pro-Sのcarboxylateが側鎖の水酸基や主鎖のアミドとの水素結合によって安定化される一方、pro-Rのcarboxylateが疎水的環境で不安定化される。その結果、pro-Rのcarboxylateが脱離し、エノラート中間体が生成する。最後に中間体に対して188番目又は74番目のシ

ステインがエナンチオ面選択的なプロトン付加を行い、生成物ができる。

- [0063] (4) 野生型もG74C/C188S変異型も、1段階目が律速になっている。
- [0064] 上記の結果より、G74C/C188S変異が、1段階目のpro-R carboxylateの脱離反応に不利な影響を及ぼし、活性が低下したことが示唆された。
- [0065] そこで、まず、1st screeningとして、188番目に対するsaturation mutagenesisを行うこととした。saturation mutagenesisとは、あるアミノ酸残基に対して19種類全ての天然アミノ酸残基に置換した変異型ライブラリーを構築することをいう。
- [0066] 一方、G74Cの変異はエナンチオ選択性の発現に必要不可欠であるため、変異導入はできない。そこで2nd screeningでは、他の残基に変異導入することにより、活性向上を試みることにした。
- [0067] 74番目・188番目以外の変異については、hydrophobic pocket(疎水性ポケット)を構成する残基やその近傍に変異を導入することで、「pro-R carboxylateの不安定化」を促進することを試みることにした。
- [0068] PDB-CODE : 3DG9(野生型)・3IP8(野生型)・3IXL(G74C/C188S変異型)・3IXM(G74C変異型)の4つの結晶構造を元に、分子モデリングを行い、疎水性ポケットを構成する残基を特定し、Pro14, Leu40, Val43, Tyr48, Leu77, Val156, Met159が、pro-R carboxylateの近傍に位置していることを確認した。
- [0069] 以上より、図2に示すDirected evolutionのスキームを計画した。すなわち、G74C/C188Sをテンプレートに、188番目の残基にsaturation mutagenesisを行い、活性の高い変異型を選抜する(1st screening)。ここで得られた変異型をテンプレートに、Leu40, Val43, Tyr48, Met73, Leu77, Val156, Met159の残基にそれぞれsaturation mutagenesisを行い選抜する(2nd screening)。さらに最も活性が高かった変異型をテンプレートに、他の6つの疎水性残基に対する選抜を行う(3rd screening)というスキームである。
- [0070] 次に、saturation mutagenesisライブラリーから、脱炭酸活性が高い変異型をスクリーニングする系を確立した。分子進化を行う際は、迅速に酵素精製と活性評価を行う必要があり、そのためには酵素にHis-tagを付加すること

が有効である。そこで、酵素の発現には、ドイツのBioSpring社から提供された、KU1201株由来AMDaseのORF遺伝子をpBADベクターに組み込んだ発現ベクターを用いることにした(WO/2005/078111)。なお、このベクターで発現したAMDaseのN末端は「MGQ」の3残基伸長しており、C末端側は「GGSHHHHHH」の9残基伸長している。

- [0071] また、基質としてフェニルマロン酸を選択した。その理由は、反応が速い基質であり、微弱なAMDase活性も検出できるためであり、また先行研究で、フェニルマロン酸に対する活性と他の基質に対する活性が相関していたためである。
- [0072] テンプレートプラスミドの特定の残基に対して、NNKコドン (NはA, G, C又はT; KはG又はT)やNHKコドン (NはA, G, C又はT; HはT, C又はA; KはG又はT)を用いたmutagenesis primerを作成し、QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit(STRATAGENE)のプロトコル(以下、「QuickChange protocol」と表記する)に従って変異導入を行った。作成した複数の変異型プラスミドで大腸菌を形質転換し、プレートにまいた。そして生じたコロニーを96穴マイクロプレートで培養した。この培養液を、剣山を用いて別のマイクロプレートに植菌した後、グリセロールを加えて、マスタープレートとして保存した。植菌後のプレートを37°Cで3時間程度培養した後、L-(+)-arabinoseを加えて酵素発現を誘導し、さらに14時間程度培養した。このプレートを遠心し、上清を除き、大腸菌をLysozyme・DNase・PMSFを含む溶液に溶かして凍らせた後、3時間37°Cでインキュベートすることにより破碎した。そしてこの無細胞抽出液を、BTBを含むフェニルマロン酸溶液に加え、基質の脱炭酸によるpHの変化をBTBで確認することにより、活性を評価した。
- [0073] 活性が高いと判断したウェルの大腸菌を、上記のマスタープレートからピックアップして、プラスミドのシーケンシングを行い、変異型を特定した。この変異型の発現宿主を培養し、菌体を回収して超音波破碎し遠心することによって調製した無細胞抽出液から、Niカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、変異型酵素を精製し、活性を評価した。

[0074] 1. G74C/C188S変異型の活性評価

上記のQuickChange protocolによって、G74C/C188S変異型を作成し、G74C/C188S変異型と野生型の比活性・ $k_{cat} \cdot K_m$ を測定した結果を表1に示す。

[表1]

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V_{max} (unit/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C	1.6	3.0	1.2	16	0.078	29
C188S	0.13	0.14	0.055	1.3	0.042	16
Wild-type(pBAD-AMDase)	550	630	260	5.1	50	18000

[0075] G74C/C188S変異型の比活性は先行研究とほぼ一致した。

[0076] 2. 1st screening - 188番目に対するsaturation mutagenesis

(1) 脱炭酸活性を指標としたスクリーニング

まず、NNNコドンで変異型ライブラリーを作成し、その中から68コロニーについて脱炭酸活性を指標としたスクリーニングを行った。その結果、G74C変異型の活性が最も高く、次いでG74C/C188G変異型の活性が高いという結果が得られた。さらに、NHKコドンを用いて、G74C/C188X(X ≠ C,W,R,G)変異型ライブラリーを構築し、76コロニーをスクリーニングした。その結果、G74C/C188G変異型よりも活性の高い変異型を得ることはできなかった。よって、188番目の残基のスクリーニングにおいて、G74C変異型が最も活性が強く、次にG74C/C188G変異型の活性が強いと判断した。

[0077] (2) 精製と活性測定

G74C/C188G変異型は、約2 gの培養菌体(液体LB培地500 mLより回収)から、Ni Sepharose High Performance(GE Healthcare)を50 mL用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。また、G74C変異型は、約1 gの培養菌体から、COSMOGEL His-Acceptゲルを2mL用いたカラムクロマトグラフィーにより精製した。

[0078] 比活性・ $k_{cat} \cdot K_m$ を解析した結果、スクリーニング段階での予測通り、変異型の活性は、G74C変異型 > G74C/C188G変異型 > G74C/C188S変異型の順に高

いことが明らかになった（表2）。

[表2]

G74C/C188S 変異型、G74C/C188G 変異型、G74C 変異型の活性

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V_{max} (unit/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C/C188G	0.10	0.120	0.050	3.3	0.015	5.6
G74C	1.6	3.0	1.2	16	0.078	29

[0079] G74C/C188G変異型は、G74C/C188S変異型に比べて、比活性が2.5倍、相対活性が5.6倍の活性向上となった。

[0080] G74C変異型によって得られる生成物はラセミ体になるので、目的の変異型ではない。そこで、G74C/C188G変異型を2nd screeningのテンプレートとした。

[0081] 3. 2nd & 3rd screening - 疎水性ポケットをターゲットとしたDirected evolution

(1) G74C/M159X/C188G変異型ライブラリー

次に、G74C/M159X/C188G変異型ライブラリーをスクリーニングすることにした。159番目の残基は、イギリスのMicklefieldらのグループが、野生型に対してsaturation mutagenesisを試みている。その結果、 K_m ベースで相対活性を50倍向上させた実績のある残基である。NNKコドンを用いて、G74C/M159X/C188G変異型ライブラリーを構築し、138コロニーをスクリーニングした。その結果、G74C/C188G変異型よりも活性が強いと推定される11株と、G74C/C188G変異型と活性が同等と推定される6株を得た。なお、これらの株は活性が強い順に1~4群に分類した。

[0082] シーケンシングをしたところ、G74C/C188G変異型よりも活性が高い株のほとんどはM159L変異であり、他にM159V変異が得られた（表3）。

[表3]

G74C/M159X/C188G 変異型ライブラリーのスクリーニングにより得られた変異型

	コロニー数	活性の強さ	変異型
WT 群(control)	4 株	+++++++	全て野生型
1 群	5 株	+++++++	全て[M159L]
2 群	3 株	+++++	全て[M159L]
G74C 群(control)	4 株	++++	全て G74C 変異型
3 群	3 株	+++	[M159L]1 株、[M159V]2 株
G74CC188G 群(control)	4 株	++	全て G74C/C188G 変異型
4 群	6 株	+	[M159L]1 株、[M159I]1 株、[M159T]2 株、 [M159P]1 株、[M159L & M159F]1 株

[0083] 精製して比活性・ k_{cat} ・ K_m を解析した結果を表4に示す。

[表4]

G74C/M159L/C188G 変異型の活性

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V_{max} (unit/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C/C188G	0.10	0.12	0.050	3.3	0.015	5.6
G74C/M159P/C188G	0.068	0.095	0.039	8.0	0.0049	1.8
G74C/M159T/C188G	0.16	0.20	0.081	4.6	0.018	6.5
G74C/M159I/C188G	0.52	0.71	0.29	7.0	0.042	15
G74C/M159V/C188G	0.73	1.0	0.42	6.5	0.064	24
G74C/M159L/C188G	6.2	8.1	3.3	5.9	0.56	210

[0084] G74C/M159L/C188G変異型はG74C/C188S変異型に比べて、比活性が150倍、相対活性が210倍の活性向上となった。(G74C/C188G変異型に比べると、比活性は60倍、相対活性は37倍である。)

(2) G74C/M159X/C188S変異型ライブラリー

次いで、G74C/C188S変異型とG74C/C188G変異型を、実際にG74C/C188S変異型をテンプレートにDirected evolutionを行うことにより比較した。

[0085] NNKコドンを用いて、G74C/M159X/C188S変異型ライブラリーを構築し、160コロニーをスクリーニングした。その結果、G74C/C188S変異型よりも活性が強いと推定されるM159S変異を1株得た。また、G74C/C188S変異型と活性が同等と推定される7株(内訳は、M159L変異が2株、M159G変異が1株、[テンプレート]が4株)を得た。

[0086] これらの変異型を精製して、比活性・ k_{cat} ・ K_m を解析した結果を表5に示す。

[表5]

G74C/M159X/C188S 変異型の活性

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V_{max} (unit/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C/M159S/C188S	0.0013	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
G74C/M159L/C188S	0.043	0.058	0.024	6.9	0.0034	1.3

[0087] さらに、G74C/C188G変異型をテンプレートに、疎水性ポケットのスクリーニングを継続することにした。

[0088] (3) 2nd screeningのまとめ

2nd screeningによって取得した変異型の比活性・ k_{cat} ・ K_m を表6に示す。

[表6]

2nd screening により得られた変異型(M159X 変異を除く)の活性

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V_{max} (unit/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C/C188G	0.10	0.12	0.050	3.3	0.015	5.6
V43L/G74C/C188G	0.098	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Y48L/G74C/C188G	0.37	0.45	0.18	5.6	0.033	12
Y48F/G74C/C188G	0.82	1.1	0.44	7.1	0.062	23
G74C/L77M/C188G	0.33	0.40	0.16	4.7	0.035	13

[0089] Y48F/G74C/C188G変異型はG74C/C188S変異型に比べて、比活性が20倍、相対活性が23倍の活性向上となった。(G74C/C188G変異型に比べると、比活性は8倍、相対活性は4倍である。)

2nd screeningにより得られた変異型の中で、最も活性が高かったのは、G74C/M159L/C188G変異型であった。そこで、この変異型をテンプレートに3rd screeningを行うこととした。

[0090] (4) 3rd screeningのまとめ

3rd screeningによって取得した変異型の比活性・ k_{cat} ・ K_m を表7に示す。

[表7]

3rd screening により得られた変異型の活性

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V _{max} (unit/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	K _m (mM)	k _{cat} /K _m (s ⁻¹ mM ⁻¹)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C/M159L/C188G	6.2	8.1	3.3	5.9	0.56	210
L40M/G74C/M159L/C188G	9.5	14	5.6	9.3	0.60	220
V43L/G74C/M159L/C188G	6.3	9.9	4.1	9.5	0.43	160
V43I/G74C/M159L/C188G	6.9	8.4	3.4	5.5	0.63	230
Y48F/G74C/M159L/C188G	24	28	11	4.6	2.5	920
M73F/G74C/M159L/C188G	1.1	1.3	0.54	6.2	0.088	32
M73A/G74C/M159L/C188G	3.6	4.2	1.7	3.6	0.48	180
G74C/L77I/M159L/C188G	4.1	4.7	1.9	3.9	0.49	180
G74C/V156I/M159L/C188G	7.9	8.7	3.5	2.4	1.5	540

[0091] 得られた変異型の活性は、G74C/M159L/C188G変異型と同等ではあったが、k_{cat}やK_mが改善したものが得られた。また、Y48F/G74C/M159L/C188G変異型がG74C/C188S変異型に比べて相対活性が920倍と、最も高い活性を示した。

[0092] 4. 基質特異性と光学純度の解析

(1) 方法

次に、1st~3rdスクリーニングにおいて、特に活性が高かった、G74C/Y48F/M159L/C188G変異型・G74C/M159L/C188G変異型・Y48F/G74C/C188G変異型・G74C/C188G変異型・G74C/C188S変異型、および野生型の基質特異性と光学純度を解析することとした。

[0093] 基質は、 α -methyl- α -phenylmalonic acid(α -メチル- α -フェニルマロン酸)、 α -methyl- α -(2-naphthyl)malonic acid(α -メチル- α -ナフチルマロン酸)及び α -(6-methoxy-2-naphthyl)- α -methylmalonic acid(α -6-(メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸)を選択した。フェニルマロン酸と α -メチル- α -フェニルマロン酸を比較することで α 位のメチル基の影響を、また α -メチル- α -フェニルマロン酸と α -メチル- α -ナフチルマロン酸を比較することでアリール基の影響を解析できると考えた。また医薬品として重要なナプロキセンに対応する α -(6-メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸を選んだ。

[0094] 活性の指標としては、比活性のみを測定した。フェニルマロン酸と同様、20mMの基質を変異型酵素で変換し、アセトニトリルを加えることで反応を停止した。この反応液を、Cosmosil 5C₁₈-AR-II(ナカライテスク)カラムを用いて逆相HPLCにより分析し、反応生成物を定量した。

[0095] この実験を行う際に用いた酵素液は、精製してから1~6ヶ月程度時間がたっており、酵素の失活が懸念された。そこで、フェニルマロン酸を基質として比活性を測定することとし、この測定値を精製直後に測定した比活性で割った値を残存活性と定義した。その結果、残存活性は50~90%程度であった。

[0096] さらに、今回の基質に対する比活性の測定値を、残存活性で割る補正を行った。(以降の解析結果は、補正後の値である。)

生成物の光学純度は以下のように測定した。まず、基質の再結晶を行い、基質にわずかに存在した生成物や不純物を除いた。この基質を用いて、後記の比活性を測定する系で酵素反応を行った。反応液に2M HClを加えることで反応を停止し、生成物をジエチルエーテルで抽出し、TMSジアゾメタンを用いてメチルエステル化した。この生成物を、キラルな担体を有するカラムを用いて、順相HPLCにより分析した。

[0097] (2) 解析結果

解析結果を表8に示す。

[表8]

AMDase 変異型の、各基質に対する比活性(unit/mg)と光学純度(%e.e.)

	α-methyl-α-phenyl malonic acid		α-methyl-α-(2-naphthyl) malonic acid		α-(6-methoxy-2-naphthyl)-α-methylmalonic acid	
	unit/mg	%e.e.	unit/mg	%e.e.	unit/mg	%e.e.
Wild-type	13	99.8(R)	120	99.8(R)	66	99.9(R)
Y48F/G74C/M159L/C188G	0.63	99.9(S)	1.7	99.7(S)	0.91	99.7(S)
G74C/M159L/C188G	1.3	99.9(S)	9.8	99.8(S)	5.1	99.7(S)
Y48F/G74C/C188G	0.014	99.8(S)	0.26	99.8(S)	0.13	99.7(S)
G74C/C188G	0.010	99.8(S)	0.46	99.8(S)	0.18	99.7(S)
G74C/C188S	0.0015	98.6(S)	0.055	91.2(S)	0.023	90.9(S)

[0098] まず、α位にメチル基を持つ基質に対して、最も活性が高かったのは、G74C/Y48F/M159L/C188G変異型ではなく、G74C/M159L/C188G変異型であった。こ

の変異型は、野生型の約10~13分の1と良好な活性を示した。また、生成物の立体配置は野生型を除き全て(S)体であり、鏡像体過剰率は、G74C/C188S変異型を除き全て99% e. e. 以上であった。

[0099] また、 α -(6-メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸の活性は、変異型に関係なく α -メチル- α -ナフチルマロン酸の活性の約半分であった。この結果より、ナフチル基の6位のメトキシ基の電子的効果が活性に影響していると推定できる。

[0100] 5. 変異型の活性のまとめ

(1) 変異型の活性

今回の1st~3rdスクリーニングで得られた変異型のフェニルマロン酸に対する活性をまとめたものを表9に示す。

[表9]

1st, 2nd, 3rd screening により得られた変異型の活性のまとめ

変異型	Specific Activity (unit/mg)	V_{max} (unit/mg)	k_{cat} (s^{-1})	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)	Relative Activity
G74C/C188S	0.040	0.050	0.020	7.5	0.0027	1.0
G74C/C188G	0.10	0.12	0.050	3.3	0.015	5.6
V43L/G74C/C188G	0.098	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Y48L/G74C/C188G	0.37	0.45	0.18	5.6	0.033	12
Y48F/G74C/C188G	0.82	1.1	0.44	7.1	0.062	23
G74C/L77M/C188G	0.33	0.40	0.16	4.7	0.035	13
G74C/M159P/C188G	0.068	0.095	0.039	8.0	0.0049	1.8
G74C/M159T/C188G	0.16	0.20	0.081	4.6	0.018	6.5
G74C/M159I/C188G	0.52	0.71	0.29	7.0	0.042	15
G74C/M159V/C188G	0.73	1.0	0.42	6.5	0.064	24
G74C/M159L/C188G	6.2	8.1	3.3	5.9	0.56	210
L40M/G74C/M159L/C188G	9.5	14	5.6	9.3	0.60	220
V43L/G74C/M159L/C188G	6.3	9.9	4.1	9.5	0.43	160
V43I/G74C/M159L/C188G	6.9	8.4	3.4	5.5	0.63	230
Y48F/G74C/M159L/C188G	24	28	11	4.6	2.5	920
M73F/G74C/M159L/C188G	1.1	1.3	0.54	6.2	0.088	32
M73A/G74C/M159L/C188G	3.6	4.2	1.7	3.6	0.48	180
G74C/L77I/M159L/C188G	4.1	4.7	1.9	3.9	0.49	180
G74C/V156I/M159L/C188G	7.9	8.7	3.5	2.4	1.5	540
Wild-type(pBAD-AMDase)	550	630	260	5.1	50	18000

[0101] G74C/M159L/C188G変異型は、G74C/C188S変異型の210倍の活性向上となった

- 。
- [0102] Y48F/G74C/M159L/C188G変異型は、G74C/C188S変異型の920倍の活性向上となった。
- [0103] (2) G74C/C188S変異型とG74C/C188G変異型の比較
G74C/C188G変異型の活性がG74C/C188S変異型に比べて大きい理由は、「グリシンがより立体障害が小さいため」もしくは「セリン水酸基と基質との水素結合が無くなったため」と推定した。
- [0104] また、 K_m は2分の1以下と改善しているのは、セリンを立体障害の小さいグリシンに置換したためと推測した。
- [0105] またスクリーニングの結果、G74C/C188AよりG74C/C188Gの活性が高かったので、188番目の立体障害も活性に影響することが分かった。
- [0106] (3) G74C変異の考察
野生型やG74A変異型に比べてG74C変異型の活性は低く、またC188S変異型に比べてG74C/C188S変異型の活性は低い。そしてG74C/C188S変異型の脱炭酸反応には、 D_2O の速度論的同位体効果が観測されない。このことから、G74Cの変異が、1段階目のpro-R carboxylate脱離反応の活性を著しく下げたと結論づけることができる。
- [0107] その理由は、「Cys74がGlyやAlaに比べて立体障害が大きいため」もしくは「Cys74と基質との水素結合」と推定できる。そこで、74番目のCysの影響を、分子モデリングにより解析した。PDB-CODE : 3IXM(G74C/C188S変異型)に、基質のフェニルマロン酸をDockingさせ、Minimizationを行った。その結果、74番目のシステインがpro-Sのcarboxylateと水素結合するモデルを得た。
- [0108] この結果より、Cys74がpro-S carboxylateと水素結合して、基質のbinding modeを乱すことで、pro-R carboxylateの不安定化が弱まり、脱炭酸活性が低下したと推測した。
- [0109] 本実施例において、アリールマロン酸脱炭酸酵素の精製、酵素活性の測定、変異体を作成しての分子進化検討は以下の方法で行った。
- [0110] (1) アリールマロン酸脱炭酸酵素の精製

変異型の発現プラスミドで形質転換した大腸菌XL1-Blueを、液体LB(amp)培地(10mL)を含む試験管2本にて30°Cで一晩培養した。これを液体LB(amp)培地(1L)を含む5L三角フラスコ2本へ植菌し、30°Cで2~5時間程度振盪培養した後、OD660を測定して0.3~0.4の範囲内であることを確認した。0.1M IPTGを終濃度0.1mMになるように1mLずつ加えることで酵素の発現を誘導し、さらに30°Cで18時間振盪培養した。得られた培養液を遠心分離(12,000g, 10min)することにより集菌した。

[0111] pH8.0, 0.5mM EDTA, 100mM Tris-HCl buffer(以下、100mM Tris緩衝液と表記する)(35mL)に集菌した大腸菌を懸濁した。培地成分の除去(洗浄)のため、再度遠心分離(12,000g, 20min)し、上清を除いた。得られた培養菌体(約4.5gを2本)を冷凍保存した。

[0112] 次に、菌体から無細胞抽出液を調製した。2本の菌体をpH8.0, 0.5mM EDTA, 10mM Tris-HCl buffer(以下、10mM Tris緩衝液と表記する)(30mL)にそれぞれ懸濁し、氷浴中で温度を低く保ちながら超音波破碎(OUTPUT 8, DUTY 20, 5 min, 2回, 2本, 標準チップ)により破碎した。得られた破碎液を遠心分離(12,000g, 20min)し、沈殿を除くことにより無細胞抽出液を調製した。

[0113] これ以降の操作は、氷浴中もしくは4°Cの冷蔵庫の中で行った。

[0114] 次に、硫酸分画を行った。無細胞抽出液の液量を測り、硫酸アンモニウム(硫酸)を30%飽和になるようにゆっくり添加し、1時間程度攪拌した。この溶液を遠心分離(12,000, 25min)した上澄みに対し、60%飽和になるように硫酸アンモニウムをゆっくり添加し、2時間以上攪拌した。この溶液をさらに遠心分離(12,000g, 50min)し、AMDaseを含むタンパク質の沈殿を得た。この沈殿を10 mM Tris緩衝液20 mLに溶解し、セルロースチューブに入れ、10mM Tris緩衝液(透析バッファー)2Lに対して透析を行い、硫酸や低分子化合物を除去した。透析バッファーは2時間後に一度交換し、さらに6時間以上透析を行った。

[0115] 次に、陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを行った。20%エタノール中で保存していたDEAE-Toyopearlゲル100mLをカラムに充填し、蒸留水300mLと1

0mM Tris緩衝液300mLを流すことにより平衡化した。これに、透析後の粗酵素液を1.0mL/minで流し、AMDaseをゲルに吸着させた。続いて10mM Tris緩衝液を300mL流した後、溶出速度1.0mL/minで0mMから200mMの直線的なNaCl濃度勾配600mLで溶出した。1フラクションあたり20mLずつ30本を回収した後、後述のBTBアッセイ法でAMDase活性のある画分を特定した。

[0116] 次に、疎水性カラムクロマトグラフィーを行った。活性画分を集め、硫酸を20%になるようにゆっくり添加した。20%エタノール中で保存していたButyl-Toyopearlゲル60mLをカラムに充填し、蒸留水180mLと20%硫酸を含む10mM Tris緩衝液180mLを流すことにより平衡化した。これに、20%硫酸を含む活性画分を1.0mL/minで流し、AMDaseをゲルに吸着させた。続いて20%硫酸を含む透析バッファー180mL流した後、溶出速度1.0mL/minで20%から0%の直線的な硫酸濃度勾配360mLで溶出した。1フラクションあたり12mLずつ30本を回収した。BTBアッセイ法でAMDase活性のある画分を特定した。

[0117] 活性画分はそれぞれSDS-PAGEで分析した。AMDaseのみが溶解している(バンドが単一である)フラクションがある場合は、その活性画分を集め、透析バッファー2Lで3時間以上2回透析することで、粗酵素溶液から硫酸とNaClを除去し、精製を完了した。バンドが単一であるフラクションが無い場合は、AMDaseのバンドが濃い活性画分を集めた後、SuperQ-Toyopearlゲルを用いた陰イオン交換カラムクロマトグラフィーと、Phenyl-Toyopearlゲルを用いた疎水性カラムクロマトグラフィーを行い、SDS-PAGEでバンドが単一になるまで精製を行った。SuperQ-Toyopearlゲルは60mLを用いて、0mMから200mMの直線的なNaCl濃度勾配360mLで溶出した。Phenyl-Toyopearlゲルは50mLを用いて、25%から0%の直線的な硫酸濃度勾配300mLで溶出した。

[0118] (2) 変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の活性測定

野生型及び変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の比活性、 K_{cat} 及び K_m は以下の方法で測定した。

[0119] (A) 基質としてフェニルマロン酸を用いた場合

(i) 比活性の測定

pH7.0、200mMフェニルマロン酸水溶液を50 μ L、1M Tris-HCl pH緩衝液を50 μ L、超純水350 μ Lを混ぜ、ヒートブロック上で30 $^{\circ}$ Cで10分以上保温した。これにAMDase溶液50 μ Lを加え、3回程ピペッティングすることで混ぜた。反応時間は、基質の変換率が10%以内になるように調節した。なぜなら、酵素反応速度は基質の濃度によって変化するからである。反応終了後アセトニトリルを500 μ L加えてクエンチした。クエンチに用いたアセトニトリルには、あらかじめ内部標準物質として20mM 2-フェニルプロピオン酸を溶かした。この反応液をそのまま逆相HPLC分析した。

[0120] これと全く同じ条件で、AMDase溶液の代わりに10mM Tris緩衝液を添加し、同様にクエンチを行い、逆相HPLC分析した。この測定結果をブランクとして、AMDase溶液のデータから差し引いた値から、比活性を計算した。

[0121] (ii) $K_{cat} \cdot K_m$ の解析

基質の終濃度を40、20、10、5、2.5、1.25、0.625mMとした反応系で比活性を測定した。基質溶液は、200mMのフェニルマロン酸溶液を段階希釈したものを50 μ L用いた。ブランクは、それぞれの基質濃度ごとに測定した。

[0122] 反応時間は、20mMの反応系での基質変換率が5%程度になるように調節した。この反応時間であれば、全ての基質濃度で、基質変換率が20%未満になることが多いからである。

[0123] 比活性の測定結果をプロットとして、「 $1/[S]-1/v$ plot」(Lineweaver-Burk plot)を引き、 k_{cat} と K_m を決定した。

[0124] (iii) 逆相HPLC分析

反応液をアセトニトリルでクエンチした溶液をそのまま分析した。フェニル酢酸と2-フェニルプロピオン酸で作成した検量線を用いて、フェニル酢酸を定量した。

[0125] 分析条件は以下の通りであった。

[0126] カラム Cosmosil 5C₁₈-AR-II (ナカライテスク)

展開溶媒 メタノール/超純水/TFA=60:40:0.05

流速 0.8mL/min

検出 254nm

各物質の保持時間は次の通りであった。

[0127] フェニルマロン酸（基質） 約4.6-4.8min

フェニル酢酸（生成物） 約6.6-6.8min

2-フェニルプロピオン酸（内部標準物質） 約8.9-9.5min

(B) 基質として α -メチル- α -フェニルマロン酸を用いた場合の比活性の測定

基質としてフェニルマロン酸を用いて比活性を測定する系において、約pH8、20mMの α -メチル- α -フェニルマロン酸を基質として酵素反応を行った。そして20mM 2-フェニル酢酸アセトニトリル溶液を用いてクエンチを行い、逆相HPLC分析した。 $K_{cat} \cdot K_m$ の解析は、基質としてフェニルマロン酸を用いた場合と同様の方法で行った。

[0128] 用いたカラムはCosmosil 5C₁₈-AR-II（ナカライテスク）、展開溶媒は、メタノール/超純水/TFA=60:40:0.05、流速は0.8mL/min、検出は254nmで行った。フェニル酢酸と2-フェニルプロピオン酸で作成した検量線を用いて、2-フェニルプロピオン酸を定量した。

[0129] (C) 基質として α -メチル- α -ナフチルマロン酸又は α -(6-メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸を用いた場合の比活性の測定

基質としてフェニルマロン酸を用いて比活性を測定する系において、約pH8、20mMの α -メチル- α -ナフチルマロン酸又は α -(6-メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸を基質として酵素反応を行った。そして20mM 2-ナフチル酢酸アセトニトリル溶液を用いてクエンチを行い、逆相HPLC分析した。 $K_{cat} \cdot K_m$ の解析は、基質としてフェニルマロン酸を用いた場合と同様の方法で行った。

[0130] 用いたカラムはCosmosil 5C₁₈-AR-II（ナカライテスク）、展開溶媒は、メタノール/超純水/TFA=65:35:0.05、流速は0.8mL/min、検出は254nmで行った。生成物と2-ナフチル酢酸で作成した検量線を用いて、生成物を定量した。

[0131] (3) アリールマロン酸脱炭酸酵素の分子進化

(i) Mutagenesis primerの設計

変異導入のプライマー対は、表10に示すものを用いた。

[表10]

Mutagenesis primer			
primer 名	予測 Tm 値[°C]	長さ [base]	5'-塩基配列 -3'
C188X(NNN)-FW	73.8-77	31	TCTGTTGTCGNNNGCGGTCTGCTTACCTTG (配列番号3)
C188X(NNN)-RV	75-79.1	31	GCAGACCGCCNNCGACAACAGAATCCCATC (配列番号4)
C188X(NHN)-FW	79.1-82	38	GATTCTGTTGTCGNNHKGCGGTCTGCTTACCTTGGACG (配列番号5)
C188X(NHN)-RV	78.9-82	37	GCAGACCGCCMDNCGACAACAGAATCCCATCGCTATC (配列番号6)
L40X-FW	79.1-82	33	GGTTTGGGCNNKGGATCCGTGACTCCCGAAGGC (配列番号7)
L40X-RV	79.1-82	36	GTCAGCGATCCMNNGCCAAACCCGACGCGATAAAC (配列番号8)
V43X-FW	76.2-80	32	CTGGGATCCNNKACTCCCGAAGGCTATGACG (配列番号9)
V43X-RV	74.9-79	30	CTTCGGGAGTMNNGGATCCGAGGCCCAAAC (配列番号10)
Y48X-FW	75-79.1	32	CTCCCGAAGGCNNKGCAGCGGTTATAGAAAGC (配列番号11)
Y48X-RV	76.2-80	32	CTATAACCGCGTCMNNGCCTTCGGGAGTCACG (配列番号12)
M73X G74C-FW	78.8-82	39	GTTGTGTCTCTC NNK TGCACCTCCTTGTGCTTCTACCGC (配列番号13)
M73X G74C-RV	78.8-82	35	CAAGGAGGTGCAMNNGAGAGACACAACGGCTGCC (配列番号14)
G74C L77X-FW	79.1-83.1	30	GCACCTCCN NK TCGTTCTACCGGGCGCGC (配列番号15)
G74C L77X-RV	78.9-82	37	CGCGGTAGAACCAMN NG GAGGTGCADATGAGAGACAC (配列番号16)
V156X-FW	79.1-82	38	GCATTACCGGAN NK GAAGCGATGGCTCGAGTGGATACC (配列番号17)
V156X-RV	78.9-82	40	GCCATCGCTTCM NN TCCGGTAATGCCTAAGCTACGACAAC (配列番号18)
M159X-FW	77.7-81	34	GTAGAAGCGN NK GCTCGAGTGGATACCGCCACTC (配列番号19)
M159X-RV	77.7-81	34	GCACTCGAGCM NN CGCTTCTACTCCGGTAATGCC (配列番号20)
V156X M159L-FW	79.1-82	38	GCATTACCGGAN NK GAAGCGTTGGOTCGAGTGGATACC (配列番号21)
V156X M159L-RV	78.9-82	40	GCCAAGCTTCM NN TCCGGTAATGCCTAAGCTACGACAAC (配列番号22)
S36X-FW	79.1-82	36	GTTTATCGCGN NK GGTTTGGGCTGGGATCCGTGAC (配列番号23)
S36X-RV	79.1-82	36	CAGGCCAAACCM NN CGGATAAACGGCAAATCCGG (配列番号24)

[0132] (ii) 変異型ライブラリーの作成

変異導入は、「QuickChange protocol」により行った。PCR酵素は、PfuUltraを用いた。PCR条件は、「QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kitのマニュアル」「PfuUltra™ HF DNA polymeraseのマニュアル」及びLei Zhen g, Jean-Louis Reymond, Nucleic Acids Research, 2004, 32, No. 14を参考に決定した。

[0133] pBADベクターを用いる場合は、L-(+)-arabinoseで酵素の発現を誘導する。そのため、L-(+)-arabinoseを取り込むことができ、かつ代謝分解しない大腸菌を宿主として選ぶ必要がある。そこで、araBAD⁻とaraEFGH⁺の遺伝子型を持ち、pBADベクターの宿主として推奨されている大腸菌top10を宿主として用

いた。

[0134] (iii) 脱炭酸活性のスクリーニング

96穴マイクロプレートの全てのウェルに、液体LB(amp)培地を150 μ Lずつ加えた。これらのウェルに変異型ライブラリーと、コントロールとしてテンプレートの変異型発現宿主をつまようじで植菌し、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。この培養液を、酵素発現用の液体LB(amp)培地100 μ L(96穴マイクロプレート)に剣山で植菌した。元の培養菌体には、80%グリセロールを50 μ L加え、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。これを、マスタープレートとした。

[0135] 酵素発現用の液体LB(amp)培地100 μ Lを37 $^{\circ}$ Cで3時間程度培養した後、0.075% L-(+)-arabinoseを含む液体LB(amp)培地50 μ Lを加えることで酵素の発現を誘導し(L-(+)-arabinoseの終濃度0.025%)、さらに37 $^{\circ}$ Cで14時間培養した。培養終了後、プレートリーダーで660nmの吸光度を測定し、各ウェルの大腸菌の生育具合を確認した。次いで遠心分離(860g, 2000rpm, 20min)を行った後、ピペットマンで上清を除いた。

[0136] 沈殿した菌体に、10mM Tris, 300mM NaCl, 1 μ g/mL DNase, 10mg/mL Lysozyme, 10 μ g/mL PMSFを100 μ L加え、-80 $^{\circ}$ Cで30min以上静置することにより凍らせた。これを37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベートした後、遠心分離(860g, 2000rpm, 45min)を行った。この上清を無細胞抽出液とした。なお、PMSFは水溶液中で分解するため、メタノール溶液として保存し、菌体に加える直前に調整した。

[0137] 無細胞抽出液20 μ Lを新しい96穴マイクロプレートに移した。これに、10mM MOPS, 25mM フェニルマロン酸, 11g/L BTBを180 μ L加えた(反応液)。直後から、プレートリーダーで660 nmの吸光度を測定し続け、また目視で反応液が緑から青に変色するのを確認した。沈殿させた破碎菌体が反応液に入ると、吸光度やBTB変色活性が見にくいので、入れないようにした。

[0138] テンプレートの変異型と比較してBTBの変色が速いと判断したウェルの大腸菌を、上記のマスタープレートから植菌して液体LB(amp)培地3.5mL(Round Bottom tube)で培養した。このうち培養液0.5mLを等量の80%グリセロールと混

ぜ、グリセロールストックとして -80°C で保存した。残りの3mLから、プラスミド抽出を行った。続いてプラスミドのシーケンシングを行い、変異型を特定した。

[0139] 変異型の発現宿主を上記のグリセロールストックから一晩前培養し、100mLの液体LB(amp)培地に1mL植菌した。これを 30°C で2~4時間程度培養して、660nmの吸光度(OD660)が0.5になったときに、10% L-(+)-arabinoseを250 μL 加えて(終濃度0.025%)、さらに14時間培養した。得られた培養液を遠心分離(12,000g, 10min)することにより集菌し、冷凍保存した。この菌体から、上記の方法でAMDaseを精製した。酵素の失活を考慮して、精製してから長くても2週間以内に変異型の活性を評価した。

[0140] (4) His-tagを含むAMDaseの精製

(i) 少量系の精製

pH8.0, 25mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 20mM imidazole buffer(以下、10mM imidazole緩衝液と表記する)10mLに培養菌体約0.5gを懸濁した。氷浴中で温度を低く保ちながら超音波破碎(OUTPUT 2~3, DUTY 20, 5min, 2回, 細長いチップ)により破碎した。以降の操作は、氷浴中もしくは 4°C の冷蔵庫の中で行った。得られた破碎液を遠心分離(8000g, 40min)し、沈殿を除くことにより無細胞抽出液を調製した。

[0141] 20%エタノール中で保存していたCOSMOGEL His-Accept(ナカライテスク)ゲル2mLをスモールカラムに充填し、蒸留水10mLと10mM imidazole緩衝液10mLを流すことにより平衡化した。これに、無細胞抽出液10mLを流し、AMDaseをゲルに吸着させた。続いて10mM imidazole緩衝液2.5mLを4回流すことで、余分なタンパク質を除去した。続いて、pH8.0, 25mM Tris-HCl, 0.5M NaCl, 60mM imidazole buffer(以下、60mM imidazole緩衝液と表記する)2.5mLを4回流すことで、AMDaseを溶出した。

[0142] 最後に、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unitsを用いて酵素液の濃縮と脱塩を行った。この操作は、imidazoleがアリアルマロン酸の脱炭酸もしくはラセミ化を触媒する可能性がある(共同研究者のRobertによる指摘)ため

と、imidazoleは280nmの吸光を持ち酵素濃度の定量に悪影響があるためである。

[0143] (ii) 大量系の精製

G74C/C188S変異型とG74C/C188G変異型はAMDase活性が微弱であったため、以下の方法により精製し、約1mg/mLの酵素液を得た。

[0144] 10mM imidazole緩衝液35mLに培養菌体約2gを懸濁した。氷浴中で温度を低く保ちながら超音波破碎(OUTPUT 8, DUTY 20, 5 min, 2回, 標準チップ)により破碎した。以降の操作は、氷浴中もしくは4°Cの冷蔵庫の中で行った。得られた破碎液を遠心分離(12,000g, 20min)し、沈殿を除くことにより無細胞抽出液を調製した。

[0145] 20%エタノール中で保存していたNi Sepharose (商標) High Performance (GE Healthcare)ゲル45mLをカラムに充填し、蒸留水150mLと10mM imidazole緩衝液150 mLを流すことにより平衡化した。これに、無細胞抽出液35mLを流し、AMDaseをゲルに吸着させた。続いて10mM imidazole緩衝液を450mL流した後、溶出速度1.0mL/minで10mMから250mMの直線的なimidazole濃度勾配900mLで溶出した。1フラクションあたり22mLずつ41本を回収した後、BTBアッセイ法でAMDase活性のある画分を特定した。なお、AMDaseは概して95~120mM imidazoleのフラクションに溶出した。活性画分を集め、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Unitsを用いて酵素液の濃縮と脱塩を行った。

[0146] (5) 変異型アリアルマロン酸脱炭酸酵素の作製

(i) 変異型の作製

上記のQuickChange protocolにより、変異型発現プラスミドを作成し、組み換え大腸菌top10を形質転換した。なお、形質転換はヒートショック法を用いた。

[0147] 育成したコロニーを爪楊枝で、別のLB(amp)培地プレートへストリークすることにより単菌化した。この爪楊枝上のコロニーを液体LB(amp)培地3.5mL (Round Bottom tube)に植菌して培養した。培養液0.5mLからグリセロールストックを作成し、残りの3mLから、プラスミド抽出を行った。続いてプラスミドの

シーケンシングを行い、目的とする変異型であることを確認した。

[0148] (ii) Mutagenesis primerの設計

上記のQuickChange protocolにより、G74A変異型の発現プラスミドから、野生型・G74C変異型・C188S変異型・G74C/C188S変異型・S36N/G74C/C188S変異型・S36N/G74C/C188G変異型・S36N/G74C/M159L/C188G変異型の発現プラスミドを作成した。

[0149] これらの変異導入に使用したプライマーを表11に示す。なお、overlapping primerになっているのはS36Nの対だけである。

[表11]

primer 名	予測 Tm 値[°C]	長さ [base]	5'-塩基配列-3'
A74G-FW	76.6	33	GTTGTGTCTCTCATGGGGACCTCCTTGTCTGTTTC (配列番号25)
A74G-RV	76.6	33	GAACGACAAGGAGGTCCCATGAGAGACACAAC (配列番号26)
G74C-FW	80.8	39	GCAGCCGTTGTGTCTCTCATGTGCACCTCCTTGTCTGTTTC (配列番号27)
G74C-RV	80.8	39	GAACGACAAGGAGGTGCACATGAGAGACACAACGGCTGC (配列番号28)
C188S-FW	75	31	GGGATTCTGTTGTCTCGAGTGGCGGTCTGCTTA (配列番号29)
C188S-RV	75	31	TAAGCAGACCGCCACTCGACAACAGAATCCC (配列番号30)
S36N-FW	79.9	36	GTTTATCGCGAACGGTTTGGGCCTGGGATCCGTGAC (配列番号31)
S36N-RV	79.9	36	CAGGCCCAAACCGTTCGCGATAAACGGCAAATCCGG (配列番号32)

[0150] (6) 基質特異性の解析

(i) 基質の再結晶

基質である α -メチル- α -フェニルマロン酸、 α -メチル- α -ナフチルマロン酸、 α -(6-メトキシ-2-ナフチル)- α -メチルマロン酸をナスフラスコに移し、ジエチルエーテルに溶解して飽和させ、少量のヘキサンを加えて密閉し、常温放置した。生成した結晶を、桐山ろ紙でろ過して回収し、デシケータに移して真空ポンプで引いて乾燥させた。

[0151] (ii) 生成物の鏡像体過剰率の測定

約50 μ molの基質を1.5mLチューブに移し、500 μ Lの超純水に溶解し、2M NaOH超純水と2M HCl超純水を用いてpH 8に合わせた。これを1mLにメスアップした後、1M Tris-HCl pH緩衝液を250 μ L加えてvortexした。この溶液を125 μ Lずつ分注し、0~100 μ Lの超純水と25~125 μ Lの酵素液を加えて、30°Cで1週

間程度反応させることで、基質を全て反応させた。

[0152] 反応液に2M HClを125 μ L加えて反応を停止した。これにジエチルエーテルを300 μ L加えてvortexし、遠心分離(13,000rpm, 2min)した後上清を採取した。この操作を3回繰り返すことで、生成物を抽出した。

[0153] 生成物を、TMSジアゾメタンを少量加えることでメチル化した。ジエチルエーテルを揮発させて、500 μ Lのジエチルエーテル：イソプロパノール=1：1溶液に溶解し、順層HPLC分析を行った。生成物の鏡像異性体のピーク面積から、鏡像体過剰率を測定した。

[0154] 実施例2 変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素の基質として α -メチル- α -フェニルマロン酸を用いた場合の活性測定

実施例1に示すように α 位にメチル基を持つ基質に対して、G74C/M159L/C188G変異型が最も活性が高かったが、さらに高活性の変異型の作製を試みた。

[0155] 実施例1に記載の方法で、G74C/M159L/C188G、G74C/M159L/C188G/V156I及びG74C/M159L/C188G/V156Lのアミノ酸変異を有する変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素を作製した。基質として α -メチル- α -フェニルマロン酸を用いて、実施例1の4と同様の方法で酵素活性を測定した。

[0156] 表12に活性測定の結果を示す。

[表12]

	K _m (mM)	V _{max} (U/mg)	k _{cat} (s ⁻¹)	k _{cat} /K _m	相対活性 (%)
G74C/M159L/C188G	1.00	0.92	0.37	0.37	100
G74C/M159L/C188G/V156I	0.49	0.94	0.38	0.78	210
G74C/M159L/C188G/V156L	0.52	1.52	0.62	1.20	323
Wild type	6.75	64.5	26.3	3.90	1047

基質： α -methyl- α -phenylmalonate

[0157] G74C/M159L/C188G変異型、G74C/M159L/C188G/V156I変異型、G74C/M159L/C188G/V156L変異型の順で、酵素との親和性を示すK_m値が向上した。また、活性も向上した。その結果、G74C/M159L/C188G変異型に対して、相対活性が2～3倍向上した変異体を得られた。

[0158] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書にとり入れるものとする。

産業上の利用可能性

[0159] 本発明のS体選択的高活性型の変異型アリアルマロン酸脱炭酸酵素を用いることにより、医農薬、液晶材料やそれらの中間体として工業的に有用なS体の α -アリアルプロピオン酸を製造することができる。

配列表フリーテキスト

[0160] 配列番号 3 ~ 3 2 プライマー

請求の範囲

- [請求項1] アリールマロン酸からS体の α -アリールプロピオン酸を生成し得る、配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列において以下の(i)の変異、(i)及び(ii)の変異、(i)及び(ii)の変異、又は(i)、(ii)及び(iii)の変異を有する、S体選択的高活性型の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素：
- (i) 第74番目のグリシンのシステインへの置換、及び第188番目のシステインのグリシンへの置換；
- (ii) 第48番目のチロシンの他のアミノ酸への置換；
- (iii) 第159番目のメチオニンの他のアミノ酸への置換。
- [請求項2] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されているG74C/C188G変異型である、請求項1記載の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。
- [請求項3] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されているG74C/M159L/C188G変異型である、請求項1記載の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。
- [請求項4] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第48番目のチロシンがフェニルアラニンに置換され、第74番目のグリシンがシステインに置換され、第159番目のメチオニンがロイシンに置換され、かつ第188番目のシステインがグリシンに置換されているY48F/G74C/M159L/C188G変異型である、請求項1記載の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。
- [請求項5] 配列番号2に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列の第74番目のグリシンがシステインに置換され、かつ第188番目のシステインがセリンに置換されているG74C/C188S変異型酵素に

比較して、酵素活性が向上している、請求項 1～3 のいずれか 1 項に記載の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素。

[請求項6] 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素をアリールマロン酸誘導体と接触させることを含む、S体の α -アリールプロピオン酸の製造方法。

[請求項7] S体の α -アリールプロピオン酸がプロフェン類である、請求項 6 記載の製造方法。

[請求項8] S体の α -アリールプロピオン酸がイブプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン及びインドプロフェンからなる群から選択される、請求項 7 記載の製造方法。

[請求項9] アリールマロン酸からS体の α -アリールプロピオン酸を生成し得る、配列番号 2 に示される野生型のアリールマロン酸脱炭酸酵素のアミノ酸配列において以下の(i)及び(ii)の変異を有する、S体選択的高活性型の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素：

(i) 第74番目のグリシンのシステインへの置換、第159番目のメチオニンのシステインへの置換、及び第188番目のシステインのグリシンへの置換；

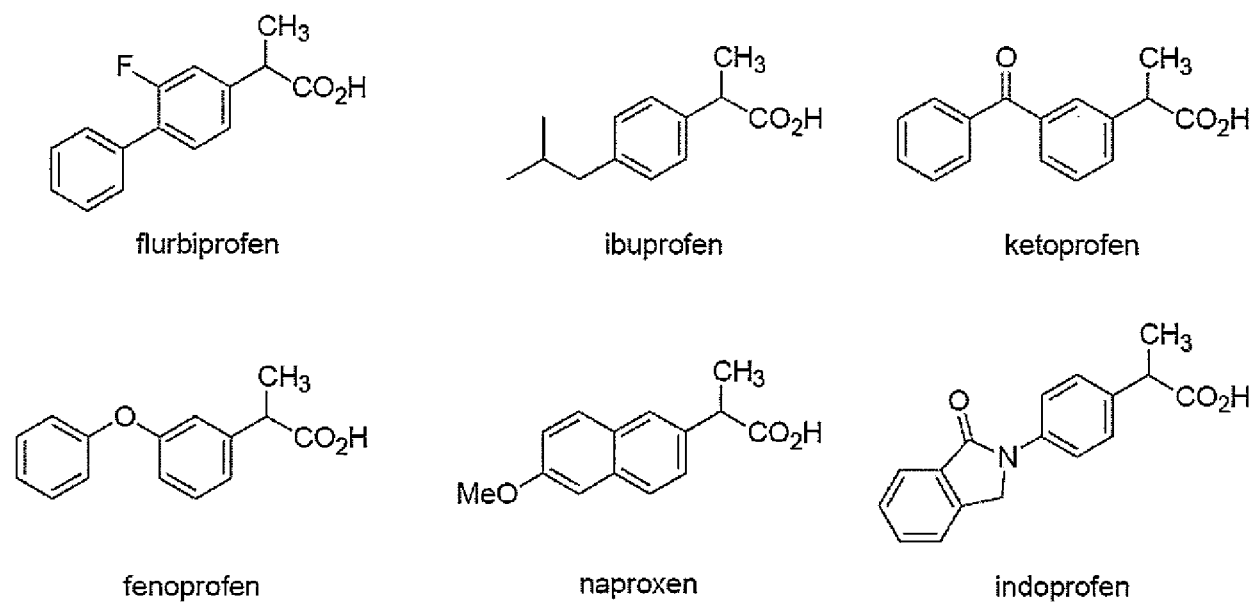
(iii) 第156番目のメチオニンのイソロイシン又はロイシンへの置換。

[請求項10] 請求項 9 記載の変異型アリールマロン酸脱炭酸酵素をアリールマロン酸誘導体と接触させることを含む、S体の α -アリールプロピオン酸の製造方法。

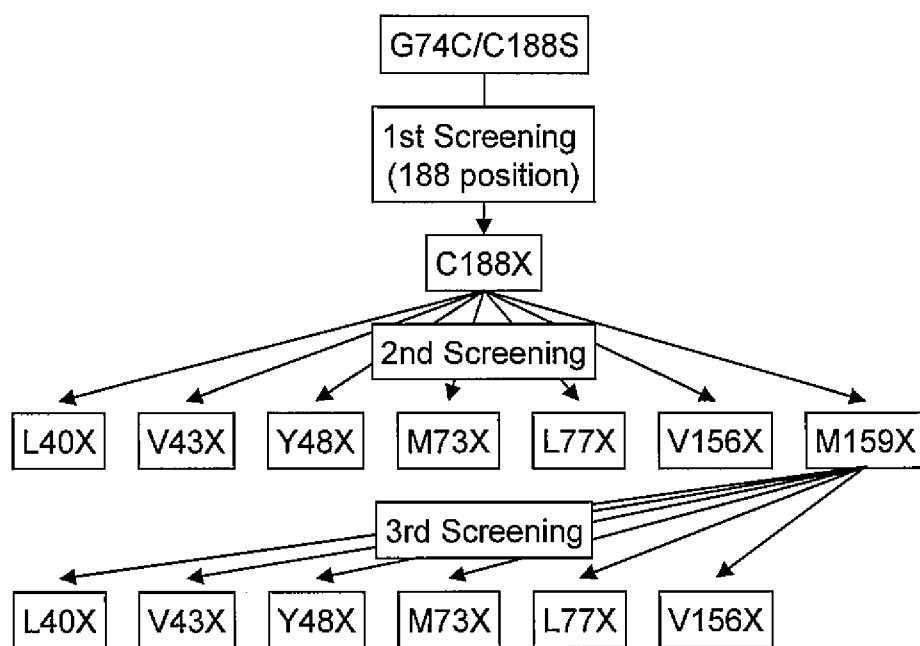
[請求項11] S体の α -アリールプロピオン酸がプロフェン類である、請求項 10 記載の製造方法。

[請求項12] S体の α -アリールプロピオン酸がイブプロフェン、ナプロキセン、フルルビプロフェン、フェノプロフェン、ケトプロフェン及びインドプロフェンからなる群から選択される、請求項 11 記載の製造方法。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054731

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12P7/40(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, C12N9/88, C12P7/40

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

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPlus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	MIYAUCHI, Y., et al., Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution, Chemical Communications, 2011.07.14, Vol.47, No.26, pp.7503-7505	1-12
Y/A	Yusuke MIYAUCHI et al., "Arylmalon San Datsu Tansan Koso no Kino Kaihen", The 14th Symposium on Biocatalyst Chemistry Japan in Shizuoka, Koen Yoshishu, 23 September 2010 (23.09.2010), pages 28 to 29	1-2, 5-8/3-4, 9-12

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
13 March, 2012 (13.03.12)Date of mailing of the international search report
19 March, 2012 (19.03.12)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/054731

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	OBATA, R., et al., Structural Basis for Inverting the Enantioselectivity of Arylmalonate Decarboxylase Revealed by the Structural Analysis of the Gly74Cys/Cys188Ser Mutant in the Liganded Form, <i>Biochemistry</i> , 2010, Vol.49, pp.1963-1969	1-2, 5-8/3-4, 9-12
Y/A	WO 2009/068308 A2 (BASF SE.), 04 June 2009 (04.06.2009), page 12, line 11 to page 16, line 1 & JP 2011-504734 A & US 2010/0311037 A1 & EP 2065470 A1 & EP 2225382 A2 & CN 101878309 A	1-2, 5-8/3-4, 9-12
Y/A	JP 2003-169685 A (Tosoh Corp.), 17 June 2003 (17.06.2003), claims 1 to 4; paragraph [0008] (Family: none)	7-8/1-6, 9-12
A	Kenji MIYAMOTO, "Arylmalon San Datsu Tansan Koso no Kino Kaihen", <i>Koso Kogaku News</i> , 2010. 10, no.64, pages 5 to 10	1-12
A	Kenji MIYAMOTO et al., "Hen'i 1 ko de Kotonaru Kino o Fuyo, Hen'i 2 ko de Koso no Enantio Sentakusei Gyakuten", <i>Bioscience & Industry</i> , 2005, vol.63, no.9, pages 583 to 586	1-12
A	TERAO Y., et al., Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis, <i>Applied Microbiology and Biotechnology</i> , 2006, Vol.73, pp.647-653	1-12

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, C12N9/88(2006.01)i, C12P7/40(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/09, C12N9/88, C12P7/40

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2012年
 日本国実用新案登録公報 1996-2012年
 日本国登録実用新案公報 1994-2012年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
PX	MIYAUCHI, Y., et al., Dramatically improved catalytic activity of an artificial (S)-selective arylmalonate decarboxylase by structure-guided directed evolution, Chemical Communications, 2011.07.14, Vol. 47, No. 26, pp. 7503-7505	1-12

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 13.03.2012	国際調査報告の発送日 19.03.2012
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 高山 敏充 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4 B 4 1 5 3

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	宮内裕介 他, アリアルマロン酸脱炭酸酵素の機能改変, 第14回生体触媒化学シンポジウム in 静岡 講演要旨集, 2010.09.23, pp.28-29	1-2, 5-8 /3-4, 9-12
Y/A	OBATA, R., et al., Structural Basis for Inverting the Enantioselectivity of Arylmalonate Decarboxylase Revealed by the Structural Analysis of the Gly74Cys/Cys188Ser Mutant in the Liganded Form, Biochemistry, 2010, Vol. 49, pp.1963-1969	1-2, 5-8 /3-4, 9-12
Y/A	WO 2009/068308 A2 (BASF SE) 2009.06.04, 第12頁第11行-第16頁第1行 & JP 2011-504734 A & US 2010/0311037 A1 & EP 2065470 A1 & EP 2225382 A2 & CN 101878309 A	1-2, 5-8 /3-4, 9-12
Y/A	JP 2003-169685 A (東ソー株式会社) 2003.06.17, 請求項1-4、 段落【0008】 (ファミリーなし)	7-8 /1-6, 9-12
A	宮本憲二, アリアルマロン酸脱炭酸酵素の機能改変, 酵素工学ニュース, 2010.10, 第64号, 第5-10頁	1-12
A	宮本憲二 他, 変異1個で異なる機能を付与、変異2個で酵素のエナンチオ選択性逆転, バイオサイエンスとインダストリー, 2005, Vol. 63, No. 9, pp.583-586	1-12
A	TERAO Y., et al., Improvement of the activity of arylmalonate decarboxylase by random mutagenesis, Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, Vol. 73, pp.647-653	1-12