(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2004-236504
(P2004-236504A)
(43)公開日　平成16年8月26日(2004.8.26)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 9/00	C12N 9/00	ZNA	4B024
C07K 14/33	C07K 14/33		4B033
C12N 9/42	C12N 9/42		4B050
C12N 11/12	C12N 11/12		4H045
// C12N 15/09	C12N 15/00	A	

審査請求 未請求　請求項の数 9　ＯＬ　（全 32 頁）

(21)出願番号　特願2003-25760 (P2003-25760)
(22)出願日　平成15年2月3日 (2003.2.3)

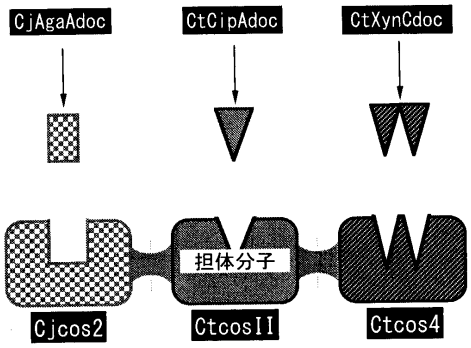
(71)出願人　000003609
株式会社豊田中央研究所
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１
(74)代理人　100097733
弁理士　北川　治
(72)発明者　梶野　勉
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１株式会社豊田中央研究所内
(72)発明者　福嶋　喜章
愛知県愛知郡長久手町大字長湫字横道４１番地の１株式会社豊田中央研究所内
(72)発明者　大宮　邦雄
三重県津市鳥居町１９１番地の２

Ｆターム(参考)　4B024 AA20 BA80 CA04 EA04 GA11

最終頁に続く

(54)【発明の名称】酵素配列複合体及び固定化酵素配列複合体とそれらの製造方法、担体分子及び酵素

(57)【要約】
【課題】新規で有利な酵素配列複合体を提供する。
【解決手段】セルロース結合蛋白質に構造的に由来する蛋白質担体分子における対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・として互いに異なる生物種起源であって所定の結合特異性の確認されたものを用い、一方、任意の特定逐次反応に順次関与する複数の酵素には上記対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・のいずれかに対して同一生物種起源であって、所定の結合特異性の確認された対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・のいずれかを付加し、これらの対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとの特異的結合により複数の酵素を制御して配列する。
【選択図】　図２



【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の担体分子（１）における複数の対酵素結合ドメインに対して、任意の特定逐次反応に順次関与する以下の複数の酵素（２）が、Ｃ１とＤ１、Ｃ２とＤ２、・・・はそれぞれ同一生物種起源であると言う関係を有する対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・と対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・との特異的結合を介して、任意の順序で配列されて結合していることを特徴とする酵素配列複合体。
（１）担体分子：セルロース分解酵素の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）に対して結合力を示す対酵素結合ドメイン（Ｃ）の複数の繰返しを有するセルロース結合蛋白質に構造的に由来し、該セルロース結合蛋白質が本来有するセルロース結合ドメイン（ＣＢＤ　）をそのまま含むかあるいはこのセルロース結合ドメインを除外した蛋白質担体分子であって、前記複数の対酵素結合ドメイン（Ｃ）のそれぞれを、互いに異なる生物種起源であって、酵素（２）に付加された同一生物種以外の起源の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）とは結合性を示さないことが確認された対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・に置換えた構造を有する。
（２）複数の酵素：任意の特定逐次反応に順次関与する複数の酵素であって、それぞれの酵素のアミノ酸配列中の適宜な位置に、対担体分子結合ドメイン（Ｄ）のうち、上記対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・のいずれかに対して同一生物種起源であって、同一生物種以外の起源の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・とは結合性を示さないことが確認された複数種類の対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・のいずれかを付加した複数の酵素。
【請求項２】
前記複数の酵素の配列の順序が、前記逐次反応に関与するプロセス上の順序に従うことを特徴とする請求項１に記載の酵素配列複合体。
【請求項３】
前記酵素配列複合体において、対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・には　Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｊｏｓｕｉ由来であって他の生物種起源の対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・とは結合性を示さない対酵素結合ドメイン（　Ｃｊｃｏｓ）が少なくとも含まれ、対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・には　Ｃ．　ｊｏｓｕｉ　由来であって他の生物種起源の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・とは結合性を示さない対担体分子結合ドメイン（　Ｃｊｄｏｃ）が少なくとも含まれることを特徴とする請求項１又は請求項２に記載の酵素配列複合体。
【請求項４】
前記対酵素結合ドメイン（　Ｃｊｃｏｓ）が　Ｃ．　ｊｏｓｕｉ　由来のコヘシンである　Ｃｊｃｏｓ１　～　Ｃｊｃｏｓ６　のいずれかから選ばれ、前記対担体分子結合ドメイン（　Ｃｊｄｏｃ）が　Ｃ．　ｊｏｓｕｉ　由来のドッケリンである　ＣｊＣｅｌＢｄｏｃ又は　ＣｊＡｇａＡｄｏｃのいずれかから選ばれることを特徴とする請求項３に記載の酵素配列複合体。
【請求項５】
請求項１～請求項４のいずれかに記載の担体分子（１）の構成を有することを特徴とする担体分子。
【請求項６】
請求項１～請求項４のいずれかに記載の複数の酵素（２）のいずれかであることを特徴とする酵素。
【請求項７】
請求項１～請求項４のいずれかに記載の複数の酵素（２）と、請求項１～請求項４のいずれかに記載の担体分子（１）とを用い、対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・と対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・との間の特異的結合を利用することにより、請求項１～請求項４のいずれかに記載の酵素配列複合体を構成することを特徴とする酵素配列複合体の製造方法。

【請求項８】
請求項１～請求項４のいずれかに記載の酵素配列複合体が固定化担体の表面に固定されていることを特徴とする固定化酵素配列複合体。
【請求項９】
請求項１～請求項４のいずれかに記載の酵素配列複合体における担体分子が前記セルロース結合ドメインをそのまま含む場合において、
請求項７に記載の酵素配列複合体を構成する工程と、該酵素配列複合体の前記担体分子を前記セルロース結合ドメインの機能を利用してセルロース質の固定化担体の表面に固定する工程とを、同時に又は任意の順序で行うことを特徴とする固定化酵素配列複合体の製造方法。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
【発明の属する技術分野】
本発明は、任意の特定逐次反応に関与する酵素群からなる複合酵素であって、これらの酵素群をミクロな蛋白質担体分子上に線状に配列させた酵素配列複合体及びその製造方法と、該酵素配列複合体を固定化担体上に固定した固定化酵素配列複合体及びセルロース結合ドメインを利用したその製造方法と、これらの製造に利用可能なように構成された蛋白質担体分子及び酵素に関する。
【０００２】
更に詳しくは、本発明は、これらの発明において特定の複数種類の酵素をミクロな蛋白質担体分子上に線状に配列させるための手段として蛋白質担体分子側に具備させる対酵素結合ドメイン（Ｃ）と、同手段として酵素側に具備させる対担体分子結合ドメイン（Ｄ）との結合特異性が、必ずしも起源生物種の区別に従わない場合がある、との新規な知見に基づいて完成されたものである。
【０００３】
【従来の技術】
酵素による触媒反応は、常温，常圧と言う緩やかな条件で進行し、公害等の心配が少なく、しかも基質特異性が優れていて反応効率が良い、等の理由から、食品工業，医薬品工業，各種の検査もしくは診断技術等に多用されている処であるが、基本的に「一酵素一反応」と言う大きな制約を持っていた。
【０００４】
【特許文献１】特開昭５７－１２０５２５号公報
【特許文献２】特開昭５９－４８０８０号公報
そこで近年、例えば特開昭５７－１２０５２５号公報に開示された「固定化複合酵素製剤」の発明や、特開昭５９－４８０８０号公報に開示された「固定化複合酵素」の発明のように、一連の逐次反応に関与する酵素群を、その酵素活性を損なわない何らかの手段によって一体化することにより、逐次反応を連続的に遂行させ得るようにした複合酵素が注目されている。
【０００５】
前記した逐次反応は、食品加工プロセス，医薬品の製造プロセス，ヒトを含む各種生物体内での正常もしくは異常な生化学反応等に限らず、自然界のあらゆる有機物質変化の場において広汎に見られるものであるため、もし実際的に有効な複合酵素が提供された場合、その技術的意義は極めて大きく、かつ、その用途には殆ど限界がない。
【０００６】
しかしながら、上記に例示したような従来の複合酵素には、２，３の大きな不具合があった。
【０００７】
例えば前記特開昭５７－１２０５２５号公報に係る発明では、生体内逐次反応の一種であるオルニチンサイクルに関与する酵素群を、フィブリン重合物中に混合状態で埋没又は結合させている。このような複合酵素系の一体化形態は、要するに各酵素をランダムに混合

させているに過ぎないため、分子レベルでは各酵素が非常に不均一な（過不足の多い）分散状態となることが避けられない。しかも、各酵素間の空間距離も、混合される酵素の濃度によって調節するしかないために、極めて大雑把で、しかも平均的な調節しかできない。これらの点から、拡散抵抗が大きく、反応効率の低い反応系となる。

【０００８】

次に、前記特開昭５９－４８０８０号公報に係る発明では、逐次反応に関与する各酵素群を、金属に被覆した樹脂等の担体表面において順次膜状に積層固定している。この場合、各酵素はそれぞれ特定の順序で膜状に偏在して固定されているため、全体として基質との接触効率が非常に悪い。又、この積層体を所定の方向に（即ち、各積層膜を所定の順序で）通過する基質以外は逐次反応が円滑に進行しない。これらの点から、やはり拡散抵抗が大きく、反応効率の低い反応系となる。

【０００９】

なお、上記いずれの従来技術においても、酵素の複合化手段がそのまま酵素の固定化手段となっており、従って若し可溶性の複合酵素が望まれる場合、これに応えることはできない。

【００１０】

以上のような問題点に鑑み、本願発明者は既に、特願平１０－３３８６７１号において、これらの不具合のない酵素配列複合体及びその製造方法と、該酵素配列複合体を固定化担体上に固定した固定化酵素配列複合体及びセルロース結合ドメインを利用したその製造方法と、これらの製造に利用可能なように構成された蛋白質担体分子及び酵素を提案している。

【００１１】

これらの発明によって、逐次反応に関与する一連の酵素を、蛋白質分子と言うミクロな担体上において正確に１個ずつ、しかも空間的に任意の順序であるいは希望する特定の順序（逐次反応に関与するプロセス上の順序に従う場合を含む）で配列させた酵素配列複合体であって、容易に可溶性状態又は不溶性の担体固定化状態とできるものを提供することが可能となった。

【００１２】

【発明が解決しようとする課題】

ところで、上記特願平１０－３３８６７１号に係る発明は、その後の本願発明者の研究により、大半の場合において確実に上記の効果を確保できるが、例外的な場合があり得ることが見出された。

【００１３】

即ち、特願平１０－３３８６７１号に係る発明において、セルロース結合蛋白質に構造的に由来する蛋白質担体分子上に所定の複数の酵素を正確に配列させる手段は、酵素側に付加するドッケリン等の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）と、蛋白質担体分子側に構成された対酵素結合ドメインの複数の繰返しにおけるコヘシン等の対酵素結合ドメイン（Ｃ）との選択的な組み合わせである。そしてその組み合わせの原理は、「一般的に、同一生物種に由来する対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとは特異的に結合し、生物種の由来の異なる対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとは結合性を示さない。」と言う技術常識であった。

【００１４】

しかしながら、本願発明者の行った、同一微生物種に由来しあるいは生物種の由来の異なる対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとの結合特異性の確認実験により、一定の例外的な場合において、生物種の由来の異なる対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとが結合性を示す場合があると言う、従来の技術常識を覆す事実が見出された。

【００１５】

この新たな知見によれば、上記特願平１０－３３８６７１号に係る発明は、大半の場合において極めて有効な効果を確保できるとしても、一定の例外的な場合にはその効果を確保できない恐れがある。

【００１６】
そこで本発明は、このような新たな知見に基づき、更に改良された酵素配列複合体及びその製造方法と、該酵素配列複合体を固定化担体上に固定した固定化酵素配列複合体及びセルロース結合ドメインを利用したその製造方法と、これらの製造に利用可能なように構成された蛋白質担体分子及び酵素を提案することを、解決すべき課題とする。
【００１７】
【課題を解決するための手段】
（第１発明の構成）
上記課題を解決するための本願第１発明（請求項１に記載の発明）の構成は、以下の担体分子（１）における複数の対酵素結合ドメインに対して、任意の特定逐次反応に順次関与する以下の複数の酵素（２）が、Ｃ１とＤ１、Ｃ２とＤ２、・・・はそれぞれ同一生物種起源であると言う関係を有する対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・と対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・との特異的結合を介して、任意の順序で配列されて結合している、酵素配列複合体である。
（１）担体分子：セルロース分解酵素の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）に対して結合力を示す対酵素結合ドメイン（Ｃ）の複数の繰返しを有するセルロース結合蛋白質に構造的に由来し、該セルロース結合蛋白質が本来有するセルロース結合ドメイン（ＣＢＤ　）をそのまま含むかあるいはこのセルロース結合ドメインを除外した蛋白質担体分子であって、前記複数の対酵素結合ドメイン（Ｃ）のそれぞれを、互いに異なる生物種起源であって、酵素（２）に付加された同一生物種以外の起源の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）とは結合性を示さないことが確認された対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・に置換えた構造を有する。
（２）複数の酵素：任意の特定逐次反応に順次関与する複数の酵素であって、それぞれの酵素のアミノ酸配列中の適宜な位置に、対担体分子結合ドメイン（Ｄ）のうち、上記対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・のいずれかに対して同一生物種起源であって、同一生物種以外の起源の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・とは結合性を示さないことが確認された複数種類の対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・のいずれかを付加した複数の酵素。
【００１８】
【非特許文献１】平成９年１２月１日　三重大学生物資源紀要第１９号
なお、このような第１発明の構成に関して、以下のイ）～ニ）の事項は、例えば「分子生物学的アプローチが明らかにしたセルラーゼの姿（大宮邦雄ら、三重大学生物資源紀要第１９号、７１～９６頁．平成９年１２月１日）」等の文献によって公知である。
【００１９】
イ）　Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｃｅｌｌｕｌｏｖｏｒａｎｓ由来の　ＣｂｐＡ　と呼ばれるセルロース結合蛋白質や、　Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｊｏｓｕｉ由来の　ＣｉｐＡ　と呼ばれるセルロース結合蛋白質が存在し、これらのセルロース結合蛋白質は、複数のコヘシン（　Ｃｏｈｅｓｉｎ）と呼ばれる酵素との結合用のドメイン（アミノ酸配列）と、ＣＢＤ　と呼ばれるセルロースとの結合用のドメイン（アミノ酸配列）とを有する。そしてセルロース結合蛋白質はＣＢＤ　によって基質としてのセルロースに結合する。
【００２０】
ロ）同上微生物由来のセルラーゼ即ちセルロース分解酵素には、ドッケリン又はドックリン（Ｄｏｃｋｅｒｉｎ）と呼ばれる、セルロース結合蛋白質との結合用の１個のドメイン（アミノ酸配列）が備わっており、このドッケリンと前記コヘシンとの結合によってセルロース分解酵素がセルロース結合蛋白質と結合する。
【００２１】
ハ）Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ　ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍにおいては、セルロース結合蛋白質が、複数のコヘシンと共にドッケリンをも備えており、このドッケリンはやはりコヘシンに対する結合性を持つと考えられる。
【００２２】

ニ）コヘシン／ドッケリンにはそれぞれ複数種類のものがあり、互いに相手のドメイン（ドッケリン／コヘシン）に対する結合特異性が異なる。

【００２３】

（第２発明の構成）

上記課題を解決するための本願第２発明（請求項２に記載の発明）の構成は、前記第１発明に係る複数の酵素の配列の順序が、前記逐次反応に関与するプロセス上の順序に従う、酵素配列複合体である。

【００２４】

（第３発明の構成）

上記課題を解決するための本願第３発明（請求項３に記載の発明）の構成は、前記第１発明又は第２発明に係る酵素配列複合体において、対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・には Ｃｌｏｓｔｒｉｄｉｕｍ ｊｏｓｕｉ由来であって他の生物種起源の対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・とは結合性を示さない対酵素結合ドメイン（ Ｃｊｃｏｓ）が少なくとも含まれ、対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・には Ｃ．ｊｏｓｕｉ 由来であって他の生物種起源の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・とは結合性を示さない対担体分子結合ドメイン（ Ｃｊｄｏｃ）が少なくとも含まれる、酵素配列複合体である。

【００２５】

（第４発明の構成）

上記課題を解決するための本願第４発明（請求項４に記載の発明）の構成は、前記第３発明に係る対酵素結合ドメイン（Ｃｊｃｏｓ ）が Ｃ．ｊｏｓｕｉ 由来のコヘシンである Ｃｊｃｏｓ１ ～ Ｃｊｃｏｓ６ のいずれかから選ばれ、前記対担体分子結合ドメイン（ Ｃｊｄｏｃ）が Ｃ．ｊｏｓｕｉ 由来のドッケリンである ＣｊＣｅｌＢｄｏｃ又は ＣｊＡｇａＡｄｏｃのいずれかから選ばれる、酵素配列複合体である。

【００２６】

なお、 Ｃｊｃｏｓ１ のアミノ酸配列を配列表の配列番号１に、 Ｃｊｃｏｓ２ のアミノ酸配列を配列表の配列番号２に、 Ｃｊｃｏｓ３ のアミノ酸配列を配列表の配列番号３に、 Ｃｊｃｏｓ４ のアミノ酸配列を配列表の配列番号４に、 Ｃｊｃｏｓ５ のアミノ酸配列を配列表の配列番号５に、 Ｃｊｃｏｓ６ のアミノ酸配列を配列表の配列番号６に、 ＣｊＣｅｌＢｄｏｃのアミノ酸配列を配列表の配列番号７に、 ＣｊＡｇａＡｄｏｃのアミノ酸配列を配列表の配列番号８に、それぞれ示す。

【００２７】

（第５発明の構成）

上記課題を解決するための本願第５発明（請求項５に記載の発明）の構成は、第１発明～第４発明のいずれかに係る担体分子（１）の構成を有する、担体分子である。

【００２８】

（第６発明の構成）

上記課題を解決するための本願第６発明（請求項６に記載の発明）の構成は、第１発明～第４発明のいずれかに係る複数の酵素（２）のいずれかである、酵素である。

【００２９】

（第７発明の構成）

上記課題を解決するための本願第７発明（請求項７に記載の発明）の構成は、第１発明～第４発明のいずれかに係る複数の酵素（２）と、第１発明～第４発明のいずれかに係る担体分子（１）とを用い、対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・と対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・との間の特異的結合を利用することにより、第１発明～第４発明のいずれかに係る酵素配列複合体を構成する、酵素配列複合体の製造方法である。

【００３０】

（第８発明の構成）

上記課題を解決するための本願第８発明（請求項８に記載の発明）の構成は、第１発明～第４発明のいずれかに係る酵素配列複合体が固定化担体の表面に固定されている、固定化

酵素配列複合体である。
【００３１】
（第９発明の構成）
上記課題を解決するための本願第９発明（請求項９に記載の発明）の構成は、第１発明～第４発明のいずれかに係る酵素配列複合体における担体分子が前記セルロース結合ドメインをそのまま含む場合において、第７発明に係る酵素配列複合体を構成する工程と、該酵素配列複合体の前記担体分子を前記セルロース結合ドメインの機能を利用してセルロース質の固定化担体の表面に固定する工程とを、同時に又は任意の順序で行う、固定化酵素配列複合体の製造方法である。
【００３２】
【発明の作用・効果】
（第１発明の作用・効果）
第１発明においては、複数種類の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・を備えた担体分子に対して、任意の特定逐次反応に順次関与する複数の酵素（１セットの酵素群）であって、それぞれ付加された対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・によって担体分子に対する結合位置を特異的に決定されたものを結合させるので、蛋白質分子と言うミクロな担体上において逐次反応に関与する一連の酵素を正確に１個ずつ配列させた酵素配列複合体となっている。
【００３３】
即ち、酵素配列複合体の担体分子（１）においては、公知のセルロース結合蛋白質に構造的に由来すると共に、その複数の対酵素結合ドメイン（Ｃ）のそれぞれを、互いに異なる生物種起源であって、複数の酵素（２）に付加された同一生物種以外の起源の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）とは結合性を示さないことが確認された対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・に置換えた構造を有する。又、酵素配列複合体の複数の酵素（２）においては、対担体分子結合ドメイン（Ｄ）のうち、上記対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・のいずれかに対して同一生物種起源であって、同一生物種以外の起源の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・とは結合性を示さないことが確認された複数種類の対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・のいずれかを付加している。
【００３４】
その結果、対担体分子結合ドメインＤ１を付加した特定の酵素は、蛋白質担体分子における対酵素結合ドメインＣ１の位置に確実に結合されている。次に、対担体分子結合ドメインＤ２を付加した特定の酵素は、蛋白質担体分子における対酵素結合ドメインＣ２の位置に確実に結合されている。同様にして、複数ないし多数の種類の特定の酵素が、蛋白質担体分子における所定の対酵素結合ドメインの位置に確実に結合されている。
【００３５】
又、この酵素配列複合体は、逐次反応の遂行に必要な一連の酵素が分子レベルにおいて全く過不足なく配列しているので、ミクロに見て基質との接触効率が最高であり、マクロに見て各酵素の完全に均一な分散系を提供できる。更に蛋白質分子と言うミクロな担体上において各酵素の空間距離を極めて小さく設定することができ、かつその空間距離を厳密に制御することができる。これらの理由から、拡散抵抗が極小である反応効率の高い逐次反応系を提供できる。
【００３６】
又、この酵素配列複合体は蛋白質としての変性を受けない環境において可溶性であり、酵素の複合化手段がそのまま酵素の固定化手段とはなっていない。従って可溶性の複合酵素としても提供できるし、第８発明又は第９発明のように固定化担体の表面に固定された不溶性の複合酵素としても提供できる。
【００３７】
（第２発明の作用・効果）
酵素配列複合体において、各酵素に付加する対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・の選択により、第１発明のように特定逐次反応に順次関与する複数の酵素が任意の順序で

配列された酵素配列複合体とすることもできるし、第２発明のように各酵素が逐次反応に関与する順序に従って配列された酵素配列複合体とすることもできるが、一般的に拡散抵抗は後者の方が更に小さいと考えられる。

【００３８】

（第３発明の作用・効果）

第１発明又は第２発明に係る酵素配列複合体の更に具体的な態様として、第３発明に係る酵素配列複合体が好ましく例示される。

【００３９】

（第４発明の作用・効果）

第３発明に係る酵素配列複合体の更に具体的な態様として、第４発明に係る酵素配列複合体が好ましく例示される。

【００４０】

（第５発明の作用・効果）

第５発明の担体分子は、後述の第７発明において第１発明～第４発明に係る酵素配列複合体の調製に用いられる構成要素として、極めて有用である。

【００４１】

（第６発明の作用・効果）

第６発明の酵素は、後述の第７発明において第１発明～第４発明に係る酵素配列複合体の製造に用いられる構成要素として、極めて有用である。

【００４２】

（第７発明の作用・効果）

第７発明によって、第１発明～第４発明に係る酵素配列複合体を有効に製造することができる。

【００４３】

（第８発明の作用・効果）

第８発明のように適当な手段によって酵素配列複合体を固定化担体の表面に固定することにより、酵素の固定化の一般的なメリット、即ち、酵素の回収・再利用や、酵素の安定性の増大等の効果を期待できる。

【００４４】

（第９発明の作用・効果）

第９発明においては、酵素配列複合体の担体分子に含まれるセルロース結合ドメインをそのまま利用してセルロース質の固定化担体に固定するので、複合酵素の固定化操作が簡易化される他、セロビオース等の脱離剤と組合わせることにより酵素複合体の精製を容易に行うことができる等の効果も期待できる。

【００４５】

【発明の実施の形態】

次に、第１発明～第９発明の実施の形態について説明する。以下において単に「本発明」と言う時は、第１発明～第９発明を一括して指している。

【００４６】

〔酵素配列複合体〕

本発明に係る酵素配列複合体における担体分子は、例えば前記公知文献に記載されたような各種のセルロース結合蛋白質に構造的に由来する（その構造が各種のセルロース結合蛋白質に由来する）蛋白質分子であって、少なくとも対酵素結合ドメインであるアミノ酸配列部分の複数の繰返しを有すると共に、これらの対酵素結合ドメイン（Ｃ）が、互いに対担体分子結合ドメインに対する結合特異性の明確に異なる複数種類の対酵素結合ドメイン、即ち、互いに異なる生物種起源であって、酵素配列複合体の酵素に付加された同一生物種以外の起源の対担体分子結合ドメイン（Ｄ）とは結合性を示さないことが確認された対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・に置換えられている。

【００４７】

これらの対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・は、代表的には、各生物種（特に各微生

物種）に見られるコヘシンと総称されるドメインの各一種であるが、コヘシンと称されないアミノ酸配列であって機能的にコヘシンと同等のものであっても良い。対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・の一部に、各生物種（特に各微生物種）に見られるドッケリン又はドックリンと総称されるドメインが用いられることがあり得る。

【００４８】

本発明に係る酵素配列複合体における複数の酵素は、任意の特定逐次反応に順次関与する複数の酵素であって、それぞれの酵素のアミノ酸配列中の適宜な位置に、対担体分子結合ドメイン（Ｄ）のうち、上記対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・のいずれかに対して同一生物種起源であって、同一生物種以外の起源の対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・とは結合性を示さないことが確認された複数種類の対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・のいずれかを付加した複数の酵素である。

【００４９】

これらの対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・は、代表的には、各生物種（特に各微生物種）に見られるドッケリン又はドックリンと総称されるドメインの各一種であるが、ドッケリン又はドックリンと称されないアミノ酸配列であって機能的にドッケリンと同等のものであっても良い。対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・の一部にドッケリンが用いられる場合においては、これに対応する対担体分子結合ドメインにコヘシンが用いられるケースがあり得る。

【００５０】

対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインに関して、一般的には、同一生物種（同一微生物種等）に由来する対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとは特異的に結合し、生物種（微生物種等）の由来の異なる対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとは結合性を示さない傾向がある。しかし本願発明者の研究により、このような傾向の例外もあることが見出された。そのため、上記のような対酵素結合ドメインＣ１，Ｃ２，・・・と対担体分子結合ドメインＤ１，Ｄ２，・・・との選択が要求されるのである。

【００５１】

前記した、「一般的に、同一生物種に由来する対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとは特異的に結合し、生物種の由来の異なる対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとは結合性を示さない。」と言う技術常識に従わない結合特異性の例外の具体的な一例を以下の表１に示す。この表１は、縦の欄に示す数種類の対酵素結合ドメインと、横の欄に示す数種類の対担体分子結合ドメインとのそれぞれの組み合わせにおける結合特異性を調べた結果を表している。

【００５２】

【表１】

	CjAgaAdoc	CjCelBdoc	CtXynAdoc	CtXynCdoc	CtCipAdoc
Cjcos1	＋	＋	＋	－	－
Cjcos2	＋＋	＋＋	＋	－	－
Cjcos5	＋＋	＋＋	＋	－	－
Cjcos6	＋＋	＋＋	＋	－	－
Ctcos1	－	－	＋＋	＋＋	－
Ctcos2	－	－	＋＋	＋＋	－
Ctcos3	－	－	＋＋	＋＋	－
Ctcos4	－	－	＋＋	＋＋	－
Ctcos7	－	－	＋＋	＋＋	－
CtcosII	－	－	－	－	＋＋

表１の縦の欄において、「Ｃｊｃｏｓ１」、「Ｃｊｃｏｓ２」、「Ｃｊｃｏｓ５」、「Ｃｊｃｏｓ６」とはそれぞれ Ｃ．ｊｏｓｕｉ 由来の６種類のコヘシンの内のｃｏｓ１、ｃｏｓ２、ｃｏｓ５、ｃｏｓ６と呼ばれるものを、「Ｃｔｃｏｓ１」、「Ｃｔｃｏｓ２」、「Ｃｔｃｏｓ３」、「Ｃｔｃｏｓ４」、「Ｃｔｃｏｓ７」とはそれぞれ Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来の９種類のコヘシンの内の ｃｏｓ１ 、ｃｏｓ２、ｃｏｓ３、ｃｏｓ４、ｃｏｓ７と呼ばれるものを、「ＣｔｃｏｓＩＩ 」とは Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のＳｄｂＡ に見出された ｔｙｐｅＩＩ のコヘシンを、それぞれ示している。上記の表１の横の欄において、「 ＣｊＡｇａＡｄｏｃ」とは Ｃ．ｊｏｓｕｉ 由来のアガロース分解酵素 ＡｇａＡ に見出されたドッケリンを、「 ＣｊＣｅｌＢｄｏｃ」とは Ｃ．ｊｏｓｕｉ 由来のセルロース分解酵素ＣｅｌＢに見出されたドッケリンを、「 ＣｔＸｙｎＡｄｏｃ」とは Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のキシロース分解酵素 ＸｙｎＡ に見出されたドッケリンを、「 ＣｔＸｙｎＣｄｏｃ」とは Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のキシロース分解酵素 ＸｙｎＣ に見出されたドッケリンを、「 ＣｔＣｉｐＡｄｏｃ」とは Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のスカッホールディン蛋白質（Ｃｉｐ）に見出されたドッケリンを、それぞれ示す。これらの内の一定のものについては、後述の実施例に関して、図及び／又は配列表にそのアミノ酸配列を示す。

【００５３】

表１における結合特異性の判定方法は次の通りである。即ち、センサーチップ上に固定したコヘシンに対し種々のドッケリンを添加し、両者が結合することにより生じる質量変化を表面プラズモン共鳴の原理によって測定することにより、コヘシン－ドッケリンの結合特性を解析し、判定した。この解析には、ビアコア社の ＢＩＡｃｏｒｅを用いた。

【００５４】

又、上記の判定方法におけるコヘシン－ドッケリンの結合特異性の評価基準は、解離定数（ＫＤ）がＫＤ≦１０$^{-9}$である場合には「＋＋」、ＫＤ＞１０$^{-9}$である場合には「＋」、結合しなかった場合には「－」と、それぞれ評価した。

【００５５】

上記の表１によれば、担体分子の対酵素結合ドメインの一種として、 Ｃｊｃｏｓ１、Ｃｊｃｏｓ２ 、 Ｃｊｃｏｓ５ あるいは Ｃｊｃｏｓ６ が含まれる場合において、

酵素に付加する対担体分子結合ドメインの一種として　ＣｔＸｙｎＡｄｏｃが含まれる、と言う組み合わせは好ましくない。一方、この組み合わせを除いては、表１から考えられる対酵素結合ドメインと対担体分子結合ドメインとの任意の組み合わせは問題がない。従って、例えば前記第４発明に係る組み合わせは、問題のない好ましい組み合わせの一例である。

【００５６】

なお、生物種の由来に基づく結合特異性の例外のケースには、▲１▼その微生物種由来のコヘシン又はドッケリンが１種類だけ知られ、それが該当する場合、▲２▼その微生物種由来のコヘシン又はドッケリンが２種類以上知られ、それらのすべてが該当する場合、▲３▼その微生物種由来のコヘシン又はドッケリンが２種類以上知られ、それらの一部のものが該当する場合、が考えられる。

【００５７】

コヘシン又はこれに機能的に同等なドメインのアミノ酸配列を例示すれば、後述の配列表における配列番号１～配列番号６に挙げるものの他、０．　Ｓｈｏｓｅｙｏｖ　ら、Ｐｒｏｃ．　Ｎａｔｌ．　Ａｃａｄ．　Ｓｃｉ．　ＵＳＡ，　８９，　３４８３－３４８７（１９９２）　、Ｕ．Ｔ．　Ｇｅｒｎｇｒｏｓｓら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，　８，　３２５－３３４（１９９３）、Ｅ．　Ｌｅｉｂｏｖｉｔｚら、Ｊ．　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，　１７８，　３０７７－３０８４（１９９６）　、Ｍ．　Ｋａｋｉｕｃｈｉ　ら、Ｊ．　Ｂａｃｔｅｒｉｏｌ．，　１８０，　４３０３－４３０８（１９９８）　、Ｐ．　Ｂｅｇｕｉｎ　ら、Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．，　３１，　２０１－２３６（１９９６）　等で公知のコヘシン配列を利用することができる。

【００５８】

次に、ドッケリン又はこれに機能的に同等なドメインのアミノ酸配列を例示すれば、後述の配列表の配列番号７又は配列番号８に挙げるものの他、Ｋ．Ｏｈｍｉｙａら、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．　Ｇｅｎｅｔ．　Ｅｎｇｉｎｅｅｒ．　Ｒｅｖ．，　１４，　３６５－４１３（１９９７）、Ｐ．　Ｂｅｇｕｉｎ　ら、Ｃｒｉｔ．　Ｒｅｖ．　Ｂｉｏｃｈｅｍ．　Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．，　３１，　２０１－２３６（１９９６）　等で公知のドッケリン配列を利用することができる。

【００５９】

担体分子は、天然の各種のセルロース結合蛋白質に構造的に由来すれば足りるのであって、取得源がこれらのセルロース結合蛋白質である必要はなく、任意の合成手段、例えば遺伝子工学的手段により作製すれば足りる。又その際、天然のセルロース結合蛋白質が本来備えているセルロース結合ドメイン（ＣＢＤ　）を含ませても良く、これを除外しても良い。

【００６０】

本発明に係る酵素配列複合体における複数の酵素は、任意の特定逐次反応に関与する酵素である。逐次反応とは、複数の素反応が連鎖的に進行する反応を言うが、その種類もしくは内容には全く限定がない。逐次反応に順次関与する一揃いの酵素群が完全に一個ずつ結合されていることが最も好ましいが、各酵素が少なくとも一個ずつ結合されている限りにおいて、任意の酵素が例えば２，３個重複して結合していても良い。特定の逐次反応に順次関与する一揃いの酵素群としては、必ずしも当該逐次反応として通常認識される全てのプロセスに関与する酵素が揃っている必要はない。なぜなら、例えば、アンモニアから尿素に至るオルニチンサイクルに関連して、一例としてアンモニアからアルギニンに至るまでの、あるいはシトルリンから尿素に至るまでの生化学変化に関与する酵素群が揃えば、特定の検査や診断等の目的を達する場合があるからである。

【００６１】

又、酵素は、その本来のアミノ酸配列中の適宜な位置に、対酵素結合ドメインに対する特異的な結合性の異なる複数種類の対担体分子結合ドメインの内のいずれかが付加されたアミノ酸配列を有する。ここに「適宜な位置」とは、ドメインの付加によって酵素活性を阻

害しない任意の位置を言い、その限りにおいて酵素の元々のアミノ酸配列のアミノ基末端（Ｎ末端）やカルボキシル基末端（Ｃ末端）に付加しても良く、酵素の元々のアミノ酸配列の任意部分に割り込む状態で付加しても構わない。

【００６２】

酵素に対担体分子結合ドメインを付加するに当たり、必ずしも天然の酵素に付加する必要はなく、任意の合成手段、例えば遺伝子工学的手段により対担体分子結合ドメインの付加された酵素を一体的に作製しても良い。

【００６３】

〔酵素配列複合体の製造方法〕

酵素配列複合体の製造方法は限定されないが、好ましくは第７発明の方法によって製造され、担体分子と上記酵素群との結合手段として両者に備わる対酵素結合ドメイン－対担体分子結合ドメイン間の結合が利用される。

【００６４】

そして担体分子における複数種類の対酵素結合ドメインの配列順序とこれらに結合する複数の酵素の対担体分子結合ドメインとを選択することにより、複数の酵素が任意の順序で配列されて結合した酵素配列複合体としたり、複数の酵素が逐次反応に関与する順序に従う配列で結合した酵素配列複合体とすることができるが、後者がより好ましい。

【００６５】

なお、担体分子における複数の酵素の配列は担体分子の高分子鎖に従う線状の配列となるが、担体分子の立体構造次第で必ずしも空間的に直線状の配列になるとは限らない。

【００６６】

〔固定化酵素配列複合体及びその製造方法〕

第８発明における固定化担体の種類や、これに対して酵素配列複合体を固定化する方法には限定がなく、公知の任意の実施形態、例えば有機ポリマー樹脂，多孔質ガラス，セラミックス等を固定化担体とし、これらの表面に物理吸着，架橋試薬等を利用した共有結合，表面電荷を利用したイオン結合等の方法によって固定化する方法等を任意に採用することができる。

【００６７】

第９発明においては、酵素配列複合体における担体分子にセルロース結合ドメインをそのまま含ませておき、このドメインの機能を利用してセファセル，セファロース等のセルロース質の固定化担体の表面に酵素配列複合体を固定的に形成することができる。

【００６８】

その際、上記の酵素配列複合体を構成する工程と、担体分子をセルロース質の固定化担体の表面に固定する工程とは、同時に又は任意の順序で行うことができる。即ち、固定化担体の表面に担体分子を固定した後に、これに所定の酵素群を結合させても良く、所定の酵素群を結合させた後の担体分子を固定化担体の表面に固定しても良く、更に双方のプロセスを同時進行させても良い。

【００６９】

【実施例】

（実施例１：コヘシン、ドッケリンの発現と精製）

Ｃ．ｊｏｓｕｉ由来のＣｉｐＡのコヘシンＣｊｃｏｓ１，Ｃｊｃｏｓ２，Ｃｊｃｏｓ５，Ｃｊｃｏｓ６、Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のＣｉｐＡのコヘシンＣｔｃｏｓ１，Ｃｔｃｏｓ２，Ｃｔｃｏｓ３，Ｃｔｃｏｓ４，Ｃｔｃｏｓ７、及びＣ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のＳｄｂＡのコヘシンＣｔｃｏｓＩＩ、更に、それぞれのコヘシンに結合する５種類のドッケリン（ＣｊＡｇａＡｄｏｃ、ＣｊＣｅｌＢｄｏｃ、ＣｔＸｙｎＡｄｏｃ、ＣｔＸｙｎＣｄｏｃ、ＣｔＣｉｐＡｄｏｃ）をコードする遺伝子を、図１にそれぞれ示すテンプレートとプライマー（Ｆｏｗａｒｄプライマー及びＲｅｖｅｒｓｅプライマー）を用いてＰＣＲにより合成した。これらの合計３０種類の各Ｆｏｗａｒｄプライマー及びＲｅｖｅｒｓｅプライマーの塩基配列を、図１の上方から下方へ記載した順序に従って、それぞれ配列表の配列番

号９～配列番号３８に順次示す。

【００７０】

これらの合成遺伝子を適当な制限酵素で切断した後、大腸菌の蛋白質発現ベクター　ｐＱＥ３０（キアゲン製）に挿入することにより、　ＨｉｓＴａｇ　配列の下流にインフレームで連結した。即ち、これらの発現ベクターにおいて、コヘシン，ドッケリンは　ＨｉｓＴａｇ　とのキメラタンパク質として発現される。この発現ベクターを大腸菌　Ｅ．　ｃｏｌｉ　Ｒ１５株に導入し、得られた形質転換体のうち、目的とする断片長の　ＤＮＡ断片を有するクローンを　ＬＢ　培地中で３７°Ｃにて振とう培養した。培養液の６００ｎｍにおける吸光度が０．４となったところで、最終濃度１ｍＭとなるように　ＩＰＴＧ　を添加し、更に５時間培養を続けることにより、コヘシン，ドッケリンの発現を誘導した。

【００７１】

誘導の終了後、培養液から遠心分離により菌体を回収し、これを抽出バッファー（５０ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ８．０）、１０ｍＭ　イミダゾール）に懸濁して、超音波処理を１ｍｉｎ．×３回行った。遠心分離により不溶画分を除き、Ｎｉ－ＮＴＡ　アガロースビーズ（キアゲン製）を添加して　ＨｉｓＴａｇ　ラベルされたタンパク質を吸着させた。これを洗浄バッファー（５０ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ８．０）、５０ｍＭ　イミダゾール）で数回洗浄した後、溶出バッファー（５０ｍＭ　リン酸バッファー（ｐＨ８．０）、２５０ｍＭ　イミダゾール）を用いて　ＨｉｓＴａｇ　ラベルされたタンパク質をビーズから溶出した。

【００７２】

得られた各タンパク質（コヘシン及びドッケリン）は、　ＳＤＳ－ＰＡＧＥ　の後にクマシー染色で検出することにより、単一バンドに精製されていること、及び予測される分子量と一致することを確認した。

【００７３】

（実施例２：コヘシン－ドッケリンの結合特性解析）

コヘシンとドッケリンの結合特性を解析するため、上記の各コヘシン　Ｃｊｃｏｓ１，Ｃｊｃｏｓ２，　Ｃｊｃｏｓ５，　Ｃｊｃｏｓ６，　Ｃｔｃｏｓ１，　Ｃｔｃｏｓ２，　Ｃｔｃｏｓ３，　Ｃｔｃｏｓ４，　Ｃｔｃｏｓ７，　ＣｔｃｏｓＩＩを、センサーチップ（　ＣＥ５、ビアコア社）上にアミンカップリングキット（ビアコア社）により固定した。一方、ＨＢＳ　バッファー（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ　）に、１．５～１０ｎＭの各濃度で、上記の各ドッケリンＣｊＡｇａＡｄｏｃ，　ＣｊＣｅｌＢｄｏｃ，　ＣｔＸｙｎＡｄｏｃ，　ＣｔＸｙｎＣｄｏｃ，　ＣｔＣｉｐＡｄｏｃを溶解した。

【００７４】

そして、上記の各固定化コヘシンに対し、各濃度の各ドッケリン溶液をそれぞれ１２０ｕＬ／ｍｉｎ．の割合で２４０秒間添加した。その後、上記のＨＢＳ　バッファーを２４０秒間流下して、各コヘシンと各ドッケリン間の結合速度定数、解離速度定数を測定し、これらの値から解離定数　ＫＤ　を算出した。

【００７５】

これらの解離定数　ＫＤ　をまとめて示したものが、前記の表１である。もともと、コヘシン－ドッケリンの結合は概ね種特異性を示し、異なる起源のものとは結合しない傾向である。しかし、表１のように　Ｃ．　ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のドッケリンＣｔＸｙｎＡｄｏｃは起源の異なる　Ｃ．　ｊｏｓｕｉ　由来の各コヘシンとも結合することが確認され、種特異性を示さないドッケリンがあることが分かった。

【００７６】

このことは、キメラコヘシンを連結させて酵素配列複合体の担体分子を構築するに当たり、他のコヘシンとは結合しないコヘシン－ドッケリンの組み合わせを良く確認してから担体分子設計を行わないと、設計通りにドッケリンを配列させることができない場合があることを示している。

【００７７】
（実施例３：配向制御タンパク質の合成）
実施例２において確認したコヘシン－ドッケリン結合特性を考慮して、Ｃｊｃｏｓ２－ＣｊＡｇａＡｄｏｃ、Ｃｔｃｏｓ４－ＣｔＸｙｎＣｄｏｃ、ＣｔｃｏｓＩＩ－ＣｔＣｉｐＡｄｏｃの３組を利用して担体分子を設計した。この担体分子は、図２に示すように、Ｃ．ｊｏｓｕｉ由来ＣｉｐＡのコヘシンＣｊｃｏｓ２のアミノ酸配列の下流に、Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来ＣｉｐＡのコヘシンＣｔｃｏｓ４及びＳｂｄＡのコヘシンＣｔｃｏｓＩＩをそれぞれ連結した構造を有する。担体分子の合成は、組換え遺伝子技術により行った。
【００７８】
即ち、Ｃ．ｊｏｓｕｉ由来のＣｉｐＡタンパク質をコードする遺伝子をテンプレートとして、プライマーＡ（５’－ａａｇ ｇａｔ ｃｃｇ ａｔｃ ｃｔａ ｃａａ ａｔｇ ｃｔｃ ｔｔａ ａａｇ－３’）及びプライマーＢ（５’－ｇａｇ ｇｃｔ ｔｔａ ｔｃｔ ｇｃｃ ｃｔｔ ｇｃａ ａｇａ ｔｃｔ ｔｃｔ ｇｔａ ｇｇｔ ｔｃｔ ｇｇｇ－３’）により、Ｃ．ｊｏｓｕｉのＣｉｐＡのうちコヘシンドメインＣｊｃｏｓ２をコードする遺伝子を合成した。
【００７９】
同様に、Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のＣｉｐＡタンパク質をコードする遺伝子をテンプレートとして、プライマーＣ（５’－ｃｃｃ ａｇａ ａｃｃ ｔａｃ ａｇａ ａｇａ ｔｃｔ ｔｇｃ ａａｇ ｇｇｃａｇａ ｔａａ ａｇｃ ｃｔｃ－３’）及びプライマーＤ（５’－ａｔｃ ｃｔｔ ａｃｔ ｇｃａ ｔｔｃ ｇａａ ｔｃａ ｔｃｃ ｇｇｃ ｔｇｔ ａｔｔ ａｃｃ ｔｃａ ｔａｔ ｃｃ－３’）により、Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍのＣｉｐＡのうちコヘシンドメインＣｔｃｏｓ４をコードする遺伝子を合成した。
【００８０】
同様に、Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍ由来のＳｂｄＡタンパク質をコードする遺伝子をテンプレートとして、プライマーＥ（５’－ａｔａ ａｇｇ ｔａａ ｔａｃ ａｇｃ ｃｇｇ ａｔｇ ａｔｔ ｃｇａ ａｔｇｃａｇ ｔａａ ｇｇａ ｔｔ－３’）及びプライマーＦ（５’－ｇｇａ ａｇｃ ｔｔｔ ｇｔｔ ｇｔａ ｔｃｔ ｃｃａ ａｃａｔｔｔ ａｃ－３’）により、Ｃ．ｔｈｅｒｍｏｃｅｌｌｕｍのＳｂｄＡのうちコヘシンドメインＣｔｃｏｓＩＩをコードする遺伝子を合成した。
【００８１】
これらの際に使用したプライマーの末端には、前あるいは後ろに連結される遺伝子の末端部の配列を付加した。上記３種の合成遺伝子をテンプレートとし、上記のプライマーＡ，Ｆを用いて、リコンビナントＰＣＲの手法により担体分子の全長をコードする遺伝子を合成した。
【００８２】
この遺伝子を制限酵素ＢａｍＨＩ，ＨｉｎｄＩＩＩで切断した後、大腸菌のタンパク質発現ベクターｐＱＥ３０のＢａｍＨＩ，ＨｉｎｄＩＩＩサイト間に挿入し、ＨｉｓＴａｇ配列の下流にインフレームで連結した。この発現ベクターを大腸菌Ｒ１５株に導入し、得られた形質転換体の内、目的とする１．５ｋｂｐ程度のＤＮＡ断片を有するクローンをＬＢ培地中で３７°Ｃにて振とう培養した。培養液の６００ｎｍにおける吸光度が０．４となったところで、最終濃度１ｍＭとなるようにＩＰＴＧを添加し、担体分子の発現を誘導した。
【００８３】
担体分子の発現を４時間誘導した後、遠心分離により菌体を回収し、実施例１と同様の方法で担体分子を精製した。担体分子はＳＤＳ－ＰＡＧＥによる分離後のクマシー染色により、ほぼ単一バンドにまで精製されていること、及び設計通りの分子量（約５０ｋＤａ）であることを確認した。

【００８４】
（実施例４：担体分子とドッケリンの結合特性）
担体分子とドッケリンの結合特性を実施例２と同様の方法により解析した。即ち、担体分子をセンサーチップ（　ＣＥ５、ビアコア社）上にアミンカップリングキット（ビアコア社）により固定し、一方でそれぞれのコヘシンに対して特異的に結合する３種類のドッケリン（　ＣｊＡｇａＡｄｏｃ，　ＣｔＣｉｐＡｄｏｃ，　ＣｔＸｙｎＣｄｏｃ）をＨＢＳ　バッファー（１０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．５）、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ　）に５ｎＭの濃度溶解し、これらをドッケリンの種類ごとに順次１２０　ｕＬ／ｍｉｎ．の割合で３００秒間添加した。
【００８５】
１種類目のドッケリンを添加し始めると、センサーチップ上に結合するドッケリン量が時間と共に増加し、一定量結合したところで飽和に達する結果が観測された。次に２種類目の異なるドッケリンを添加すると、再びセンサーチップ上への結合が観測され、同様に一定量結合後、飽和した。３種類目のドッケリンについても同じ結果が観測された。これらの様子を図３に示す。図３において「ＲＵ」は結合量を表す単位である。
【００８６】
図３の結果は、添加したドッケリンが担体分子を構成する特定のコヘシンと結合し、他のコヘシンには結合していないことを示しており、本発明により合成した担体分子は、設計通りの特異性の高い結合特性を有することが確認された。
【００８７】
（酵素配列複合体の活性）
上記のような担体分子に基づいて作成される本発明の酵素配列複合体については、例えば公知文献である特願平１０－３３８６７１の明細書に記載された実施例４等により、酵素複合体としての高い活性を有することが、一般に承知されている。
【配列表】

SEQUENCE LISTING

〈110〉 KABUSIKI KAISHA TOYOTA CHUO KENKYUSHO

〈120〉酵素配列複合体及び固定化酵素配列複合体とそれらの製造方法、担体分子及び酵素

〈130〉 POK-02-029

〈160〉 38

〈210〉 1
〈211〉 145
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 1

```
Thr Asn Gly Leu Lys Val Ser Val Gly Thr Ala Val Gly Ala Pro Gly
                5                  10                  15
Asp Thr Val Thr Val Pro Val Thr Phe Ala Asp Val Ala Lys Val Asn
            20                  25                  30
Asn Val Gly Thr Cys Asn Phe Tyr Leu Gly Tyr Asp Ala Ser Leu Leu
        35                  40                  45
Asp Val Val Ser Val Asp Ala Gly Pro Ile Val Lys Asn Ala Ala Val
    50                  55                  60
Asn Phe Ser Ser Ser Ala Ser Asn Gly Thr Ile Ser Phe Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80
```

Asp Asn Thr Ile Thr Asp Glu Leu Ile Thr Ser Asp Gly Val Phe Ala
85 90 95
Asn Ile Thr Phe Lys Ile Lys Ser Thr Ala Thr Gln Gly Thr Thr Pro
100 105 110
Ile Thr Phe Lys Asp Gly Gly Ala Phe Gly Asp Gly Thr Met Ser Lys
115 120 125
Ile Ala Ser Val Ile Lys Thr Ser Gly Ser Val Val Ile Ser Pro Asp
130 135 140
Pro
145

〈210〉 2
〈211〉 148
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 2
Thr Asn Ala Leu Lys Val Thr Val Gly Thr Ala Glu Gly Asn Val Gly
5 10 15
Glu Thr Val Thr Val Pro Val Thr Phe Ala Asp Val Ala Lys Val Asn
20 25 30
Asn Val Gly Thr Cys Asn Phe Tyr Leu Ala Tyr Asp Ala Ser Leu Leu
35 40 45
Asp Val Val Ser Val Asp Ala Gly Pro Ile Val Lys Asn Ala Ala Val
50 55 60
Asn Phe Ser Ser Ser Ala Ser Asn Gly Thr Ile Ser Phe Leu Phe Leu
65 70 75 80
Asp Asn Thr Ile Thr Asp Glu Leu Ile Thr Ser Asp Gly Val Phe Ala
85 90 95

```
Asn Ile Thr Phe Lys Leu Lys Asn Val Ser Thr Lys Thr Thr Thr Pro
            100                 105                 110
Ile Thr Phe Lys Asp Gly Gly Ala Phe Gly Asp Gly Thr Met Ser Lys
        115                 120                 125
Ile Thr Thr Val Ile Lys Thr Asn Gly Ser Val Thr Ile Ile Pro Gly
    130                 135                 140
Asp Pro Glu Pro
145         148
```

〈210〉 3
〈211〉 148
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 3

```
Thr Glu Asp Leu Asn Val Ala Val Gly Thr Ala Glu Gly Asn Val Gly
                5                   10                  15
Glu Thr Val Thr Val Pro Val Thr Phe Ala Asn Val Ala Lys Val Asn
            20                  25                  30
Asn Val Gly Thr Cys Asn Phe Tyr Leu Ala Tyr Asp Ala Ser Leu Leu
        35                  40                  45
Asp Val Val Ser Val Asp Ala Gly Pro Ile Val Lys Asn Ala Ala Val
    50                  55                  60
Asn Phe Ser Ser Ser Ala Ser Asn Gly Thr Ile Ser Phe Leu Phe Leu
65                  70                  75                  80
Asp Asn Thr Ile Thr Asp Glu Leu Ile Thr Ser Asp Gly Val Phe Ala
                85                  90                  95
Asn Ile Thr Phe Lys Leu Lys Asn Val Ser Thr Lys Thr Thr Thr Pro
            100                 105                 110
```

Ile Ser Phe Lys Asp Gly Gly Ala Phe Gly Asp Gly Asn Met Ala Lys
115 120 125
Ile Ala Thr Val Val Lys Thr Asn Gly Ser Val Thr Ile Ile Pro Gly
130 135 140
Asp Pro Glu Pro
145 148

〈210〉 4
〈211〉 148
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 4
Thr Glu Asp Leu Asn Val Ala Val Gly Thr Ala Glu Gly Asn Val Gly
5 10 15
Asp Thr Val Thr Val Pro Val Thr Phe Ala Asn Val Ala Lys Val Asn
20 25 30
Asn Val Gly Thr Cys Asn Phe Tyr Leu Thr Tyr Asp Ala Ser Leu Leu
35 40 45
Asp Val Val Ser Val Asp Ala Gly Pro Ile Val Lys Asn Ala Ala Val
50 55 60
Asn Phe Ser Ser Ser Ala Ser Asn Glu Thr Ile Ser Phe Leu Phe Leu
65 70 75 80
Asp Asn Thr Ile Thr Asp Glu Leu Ile Thr Ser Asp Gly Val Phe Ala
85 90 95
Asn Ile Thr Phe Lys Leu Lys Ser Val Ser Thr Lys Thr Thr Thr Pro
100 105 110
Ile Ser Phe Lys Asp Gly Gly Ala Phe Gly Asp Gly Thr Met Ala Lys
115 120 125

Ile Ala Thr Val Val Lys Thr Asn Gly Ser Val Thr Ile Ile Pro Gly
130 135 140
Asp Pro Glu Pro
145 148

〈210〉 5
〈211〉 148
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 5
Thr Glu Asp Leu Asn Val Ala Val Gly Thr Ala Glu Gly Asn Val Gly
5 10 15
Asp Thr Val Thr Val Pro Val Thr Phe Ala Asn Val Ala Lys Val Asn
20 25 30
Asn Ile Gly Thr Cys Asn Phe Tyr Leu Thr Tyr Asp Ala Ser Leu Leu
35 40 45
Asp Val Val Ser Val Ala Ala Gly Pro Ile Val Lys Asn Ala Ala Val
50 55 60
Asn Phe Ser Ser Ser Ala Ser Asn Gly Thr Ile Ser Phe Leu Phe Leu
65 70 75 80
Asp Asn Thr Ile Thr Asp Glu Leu Ile Thr Ser Asp Gly Val Phe Ala
85 90 95
Asn Ile Thr Phe Lys Leu Lys Ser Val Ser Thr Lys Thr Thr Thr Pro
100 105 110
Ile Ser Phe Lys Asp Gly Gly Ala Phe Gly Asp Gly Thr Met Ala Lys
115 120 125
Ile Ala Thr Val Val Lys Thr Asn Gly Ser Val Thr Ile Asp Val Gly
130 135 140

Glu Pro Val Val
145 148

〈210〉 6
〈211〉 142
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 6

Thr	Gly	Leu	Gly	Val	Lys	Ile	Ala	Ser	Val	Thr	Gly	Lys	Thr	Gly	Asp
				5					10					15	
Thr	Ile	Thr	Val	Pro	Val	Thr	Leu	Ser	Asn	Val	Ala	Thr	Val	Gly	Asn
			20					25					30		
Val	Gly	Thr	Cys	Asn	Phe	Tyr	Ile	Thr	Tyr	Asp	Pro	Thr	Leu	Leu	Gln
		35					40					45			
Ala	Val	Ser	Ala	Thr	Ala	Gly	Asp	Ile	Val	Ile	Asn	Ala	Pro	Val	Asn
	50					55					60				
Phe	Ser	Ser	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Gly	Thr	Ile	Ser	Ile	Leu	Phe
65					70					75					80
Leu	Asp	Asn	Thr	Ile	Thr	Asp	Gln	Pro	Ile	Ala	Ser	Asp	Gly	Val	Ile
				85					90					95	
Thr	Asn	Leu	Thr	Phe	Lys	Val	Leu	Gly	Ser	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Pro
			100					105					110		
Ile	Ala	Phe	Lys	Ala	Gly	Gly	Ala	Phe	Gly	Asn	Gly	Asn	Met	Ala	Lys
		115					120					125			
Ile	Ser	Asp	Ile	Thr	Phe	Thr	Asn	Gly	Ser	Ala	Lys	Leu	Asn		
	130					135					140				

142

〈210〉 7

〈211〉 56
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 7

```
Gly Asp Val Asn Asn Asp Gly Ala Ile Asp Ala Leu Asp Ile Ala Ala
                5                  10                  15
Leu Lys Lys Ala Ile Leu Thr Gln Ser Thr Ser Asn Ile Asn Leu Thr
            20                  25                  30
Asn Ala Asp Met Asn Asn Asp Gly Asn Ile Asp Ala Ile Asp Phe Ala
        35                  40                  45
Gln Leu Lys Val Lys Leu Leu Asn
    50                  55  56
```

〈210〉 8
〈211〉 74
〈212〉 PRT
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 8

```
Gly Asp Val Asp Gly Asn Gly Met Ile Asp Ala Leu Asp Tyr Ser Leu
                5                  10                  15
Val Lys Arg Tyr Leu Leu Gly Gln Ile Ser Asp Cys Pro Asp Ser Lys
            20                  25                  30
Gly Lys Leu Ala Ala Asp Val Asp Gly Asp Gln Gln Ile Thr Ala Leu
        35                  40                  45
Asp Phe Ser Leu Ile Lys Gln Tyr Leu Leu Gly Thr Ile Asn Lys Phe
    50                  55                  60
Pro Ala Gln Thr Ala Ser Lys Ile Lys Pro
```

65 70 74

〈210〉 9
〈211〉 32
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 9
aacatatgat agagttttgg tgatgttgac gg 32

〈210〉 10
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 10
ttgtcgacga gattatggct tgattttact tgc 33

〈210〉 11
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 11
aacatatggg tttaaaaggc gatgtcaata atg 33

〈210〉 12
〈211〉 33
〈212〉 DNA

〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 12
aagtcgacct aattgagcag tttaactttt agc 33

〈210〉 13
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 13
aacatatgca ggttttgggt gacttgaacg g 31

〈210〉 14
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 14
aagtcgacgc gtggaaaaga tcaaattata ccg 33

〈210〉 15
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 15
aactaatggt tatacccggt gacgtaaacg g 31

〈210〉 16
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 16
aagtcgacga tcaaagttct ctcagaacga g 31

〈210〉 17
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 17
caggatccgg agacatagtg aaagacaatt c 31

〈210〉 18
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 18
ccaagcttac tgtgcgtcgt aatcacttg 29

〈210〉 19
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 19

gctagcggta atacaaatgg tcttaag 27

〈210〉 20

〈211〉 31

〈212〉 DNA

〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 20

gtcgactaag gatctggact tataactaca c 31

〈210〉 21

〈211〉 27

〈212〉 DNA

〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 21

gctagcgatc ctacaaatgc tcttaaa 27

〈210〉 22

〈211〉 30

〈212〉 DNA

〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 22

gtcgactaaa gatcttctgt aggttctggg 30

〈210〉 23

〈211〉 27

〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 23
gctagcgaac ctacagaaga tcttaat 27

〈210〉 24
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 24
gtcgactatg taacaacagg ctcaccaac 29

〈210〉 25
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 25
gctagcgtta caggacttgg agtaaag 27

〈210〉 26
〈211〉 27
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium josui

〈400〉 26
gtcgacttaa ttaagttttg cacttcc 27

〈210〉 27
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 27
gcggagctcg gccacaatga cagtcgaga 27

〈210〉 28
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 28
gcgcgaagct tttacggtac ggaactacca agat 34

〈210〉 29
〈211〉 29
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 29
gcggagctcg tcagacggtg tggtagtag 29

〈210〉 30
〈211〉 37
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 30
gcgcgaagct tttacggtgg tgttgcattg gcaacgt 37

〈210〉 31
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 31
gcgggatccg gatgatccga atgcaataaa g 31

〈210〉 32
〈211〉 34
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 32
gcgggtacct taatctccaa catttactcc accg 34

〈210〉 33
〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 33
gcgcatatgg attcgaatgc agtaaggatt aag 33

〈210〉 34

〈211〉 33
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 34
gcggtcgacc tatgttgtat ctccaacatt tac 33

〈210〉 35
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 35
agactcggat gcagtaagga ttaa 24

〈210〉 36
〈211〉 24
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 36
gtcgactcta gacatctcca acat 24

〈210〉 37
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

〈400〉 37

ggatccgcaa gggcagataa agcctcgagc a 31

〈210〉 38
〈211〉 31
〈212〉 DNA
〈213〉 Clostridium thermocellum

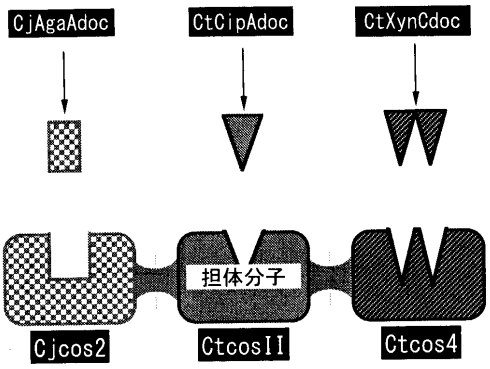
〈400〉 38
ctgcaggcga aggcgtctga gtcggtttaa c 31

【図面の簡単な説明】
【図１】
実施例に係るテンプレートとプライマーの一覧である。
【図２】
実施例に係る担体分子の概念図である。
【図３】
実施例に係る担体分子とコヘシンの結合特性を示すグラフである。

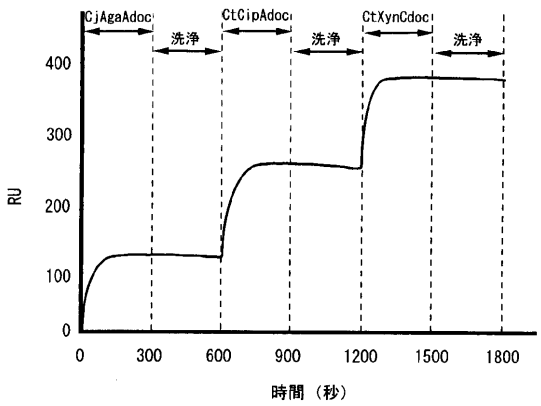
【図１】

遺伝子	テンプレート	プライマー	配列
CjAgaAdoc	CjAgaA	CjAgaAdoc/F	AACATATGATAGAGTTTTGGTGATGTTGACGG
		CjAgaAdoc/R	TTGTCGACGAGATTATGGCTTGATTTTACTTGC
CjCelBdoc	CjCelB	CjCelBdoc/F	AACATATGGGTTTAAAAGGCGATGTCAATAATG
		CjCelBdoc/R	AAGTCGACCTAATTGAGCAGTTTAACTTTAGC
CtXynAdoc	CtXynA	CtXynAdoc/F	AACATATGCAGGTTTTGGGTGACTTGAACGG
		CtXynAdoc/R	AAGTCGACGCGTGGAAAAGATCAAATTATACCG
CtXynCdoc	CtXynC	CtXynCdoc/F	AACTAATGGTTATACCCGGTGACGTAAACGG
		CtXynCdoc/R	AAGTCGACGATCAAAGTTCTCTCAGAACGAG
CtCipAdoc	CtCipA	CtCipAdoc/F	CAGGATCCGGAGACATAGTGAAAGACAATTC
		CtCipAdoc/R	CCAAGCTTACTGTGCGTCGTAATCACTTG
Cjcos1	CjCipA	Cjcos1/F	GCTAGCGGTAATACAAATGGTCTTAAG
		Cjcos1/R	GTCGACTAAGGATCTGGACTTATAACTACAC
Cjcos2	CjCipA	Cjcos2/F	GCTAGCGATCCTACAAATGCTCTTAAA
		Cjcos2/R	GTCGACTAAAGATCTTCTGTAGGTTCTGGG
Cjcos5	CjCipA	Cjcos5/F	GCTAGCGAACCTACAGAAGATCTTAAT
		Cjcos5/R	GTCGACTATGTAACAACAGGCTCACCAAC
Cjcos6	CjCipA	Cjcos6/F	GCTAGCGTTACAGGACTTGGAGTAAAG
		Cjcos6/R	GTCGACTTAATTAAGTTTTGCACTTCC
Ctcos1	CtCipA	Ctcos1/F	GCGGAGCTCGGCCACAATGACAGTCGAGA
		Ctcos1/R	GCGCGAAGCTTTTACGGTACGGAACTACCAAGAT
Ctcos2	CtCipA	Ctcos2/F	GCGGAGCTCGTCAGACGGTGTGGTAGTAG
		Ctcos2/R	GCGCGAAGCTTTTACGGTGGTGTTGCATTGGCAACGT
Ctcos3	CtCipA	Ctcos3/F	GCGGGATCCGGATGATCCGAATGCAATAAAG
		Ctcos3/R	GCGGGTACCTTAATCTCCAACATTTACTCCACCG
Ctcos4	CtCipA	Ctcos4/F	GCGCATATGGATTCGAATGCAGTAAGGATTAAG
		Ctcos4/R	GCGGTCGACCTATGTTGTATCTCCAACATTTAC
Ctcos7	CtCipA	Ctcos7/F	AGACTCGGATGCAGTAAGGATTAA
		Ctcos7/R	GTCGACTCTAGACATCTCCAACAT
CtcosII	CtSdbA	CtcosII/F	GGATCCGCAAGGGCAGATAAAGCCTCGAGCA
		CtcosII/R	CTGCAGGCGAAGGCGTCTGAGTCGGTTTAAC

【図２】



【図３】



フロントページの続き

Ｆターム(参考) 4B033 NA26 NB45 NB57 NC04 NC12 NC13
4B050 CC08 GG06 GG10 LL05
4H045 AA10 AA30 BA10 CA11 EA65 FA74 FA82