

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4663631号
(P4663631)

(45) 発行日 平成23年4月6日 (2011.4.6)

(24) 登録日 平成23年1月14日 (2011.1.14)

(51) Int. Cl.	F I
C 1 2 N 9/78 (2006.01)	C 1 2 N 9/78
A 2 3 L 1/28 (2006.01)	A 2 3 L 1/28 A
A 2 3 L 1/221 (2006.01)	A 2 3 L 1/221 H
C 1 2 P 19/30 (2006.01)	C 1 2 P 19/30
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
請求項の数 11 (全 33 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2006-512784 (P2006-512784)	(73) 特許権者	000216162
(86) (22) 出願日	平成17年4月26日 (2005.4.26)		天野エンザイム株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/007892		愛知県名古屋市中区錦1丁目2番7号
(87) 国際公開番号	W02005/105991	(74) 代理人	100114362
(87) 国際公開日	平成17年11月10日 (2005.11.10)		弁理士 萩野 幹治
審査請求日	平成19年12月18日 (2007.12.18)	(72) 発明者	水口 涼子
(31) 優先権主張番号	特願2004-134464 (P2004-134464)		滋賀県長浜市八幡東町322-1番地 ビ
(32) 優先日	平成16年4月28日 (2004.4.28)		ュアハートA6
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	森 茂治
			愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 天
			野エンザイム株式会社
		(72) 発明者	東本 篤樹
			岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35
			天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 放線菌由来のAMPデアミナーゼ及びその利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の性質を備える ストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼ：

(1) 作用

アデノシンを構成成分とする5'-ヌクレオチドに作用し、該5'-ヌクレオチドを脱アミノする反応を触媒する。

(2) 基質特異性

アデノシンを構成成分とする5'-ヌクレオチドである5'AMP、5'dAMP、ADP、ATP、3'5' cyclic AMPに作用し、そして5'AMPに最もよく作用する。

(3) 作用温度

40℃～75℃の範囲で相対活性が50%以上である（相対活性は65℃で反応させたときの活性値を100%とした場合）。

(4) 温度安定性

65℃以下で安定である。

(5) 至適pH

至適pHが5.6である。

(6) pH安定性

pH6.0～8.5で安定である。

(7) 分子量

分子量が48,000±2,000（ゲルろ過による）、60,000±3,000（SDS-PAGEによる）である

10

20

。

【請求項 2】

アデノシンを構成成分とする5'-ヌクレオチドが5'-アデニル酸である請求項1に記載のストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼ。

【請求項 3】

請求項 1 又は 2 に記載のストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼを作用させるステップ、を含んでなる、酵母エキスの製造方法。

【請求項 4】

アデノシンを構成成分とする5'-ヌクレオチドに請求項 1 又は 2 に記載のストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼを作用させ、該5'-ヌクレオチドを脱アミノ化してなる旨味物質の製造方法。

10

【請求項 5】

ストレプトマイセス・ミュリナスを栄養培地で培養し、培養液中に請求項 1 又は 2 に記載のストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼを生成せしめ、これを採用することを特徴とするAMPデアミナーゼの製造方法。

【請求項 6】

以下の (a) 又は (b) からなる単離されたAMPデアミナーゼ：

(a) 配列番号：1 のアミノ酸配列を含むタンパク質；

(b) 配列番号：1 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、置換、挿入若しくは付加されてなるアミノ酸配列を含み、AMPデアミナーゼとして機能するタンパク質。

20

【請求項 7】

請求項 6 に記載のAMPデアミナーゼをコードする単離された核酸分子。

【請求項 8】

以下の (a) ～ (c) のいずれかの塩基配列を含む、請求項 7 に記載の単離された核酸分子：

(a) 配列番号：3 ～ 5 のいずれかの塩基配列；

(b) (a) の塩基配列において1 若しくは数個の塩基が欠失、置換、挿入若しくは付加されてなる塩基配列であって、AMPデアミナーゼとして機能するタンパク質をコードする塩基配列；

30

(c) (a) 又は (b) の塩基配列と相補的な塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、AMPデアミナーゼとして機能するタンパク質をコードする塩基配列。

【請求項 9】

請求項 7 又は 8 に記載の核酸分子を保有するベクター。

【請求項 10】

請求項 7 又は 8 に記載の核酸分子が導入されている形質転換体。

【請求項 11】

以下の (1) 及び (2) のステップを含む、AMPデアミナーゼの生産方法。

(1) 請求項 10 に記載の形質転換体を、前記核酸分子のコードするタンパク質を産生可能な条件で培養するステップ；及び

40

(2) 産生されたタンパク質を回収するステップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はAMPデアミナーゼに関する。詳しくは、微生物由来のAMPデアミナーゼ及びその利用に関する。

【背景技術】

【0002】

AMPデアミナーゼは、別名アデニルデアミナーゼ、AMPアミノヒドロラーゼ等とも呼ばれ

50

、アデニル酸を加水分解的に脱アミノしてイノシン酸とアンモニアを生成する反応を触媒する。AMPデアミナーゼは動物生体組織に広く存在し、これまでに様々な種の様々な組織から分離されている（藤島鉄郎及び吉野宏, Amino Acid・Nucleic Acid, 第16号, pp45-55（1967年）：非特許文献1、Magdale'na Rosinova' ら, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 第43巻, pp2324-2329(1978年)：非特許文献2、特開昭55-120788号公報：特許文献1）。一方、主に工業的利用の見地から、微生物由来のAMPデアミナーゼの探索が精力的に行われてきた。特に、糸状菌由来のAMPデアミナーゼに関する研究は多く、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来のAMPデアミナーゼ等、一部のAMPデアミナーゼについては、酵母エキスの製造における旨味増強などを目的としてその工業的な利用が図られている。

10

【0003】

【特許文献1】特開昭55-120788号公報

【非特許文献1】藤島鉄郎及び吉野宏, Amino Acid・Nucleic Acid, 第16号, pp45-55（1967年）

【非特許文献2】Magdale'na Rosinova' ら, Collection Czechoslov. Chem. Commun. 第43巻, pp2324-2329(1978年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

現在、酵母エキスの製造において一般に、旨味増強のためヌクレアーゼとAMPデアミナーゼが使用されている。一般にヌクレアーゼの至適温度は約65℃である。一方で現在使用されているアスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来のAMPデアミナーゼの至適温度は約50℃である。従って、製造上、高温で同時に二つの酵素を作用させることは不可能であって、ヌクレアーゼ処理と、AMPデアミナーゼ処理とを別個の工程として行わざるを得なかった。耐熱性に優れたAMPデアミナーゼであれば、これをヌクレアーゼと同時に作用させることができ、製造工程の短縮化が達成される。また、これら二つの酵素による処理工程を高温で実施することが可能となることから、製造過程において処理温度をAMPデアミナーゼの反応温度である約50℃に一旦下げる必要がなくなり、雑菌汚染を有効に防止することができる。このように、特に工業的利用をする上で耐熱性AMPデアミナーゼは多くの利点を有するものであって、それを見出すことが切望されていた。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者らは以上の背景の下、AMPデアミナーゼの由来を微生物に求めてスクリーニングを実施した。その結果、ストレプトマイセス属の放線菌が、熱安定性の高いAMPデアミナーゼを生産していることを見出した。また、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) の産生するAMPデアミナーゼが特に熱安定性に優れるとの知見を得た。

以上の知見を得た後、本発明者らは当該酵素（ストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼ）を同定することを試みた。その結果、後述の実施例に示すように当該酵素の同定に成功し、そのアミノ酸配列及び塩基配列を明らかにした。この成果によって当該酵素を組み換え体として生産することが可能となり、また遺伝子組換えの手法を用いて当該酵素の生産性の向上や酵素本体の改良を行うことが可能となった。

30

40

本発明は以上の成果に基づき完成されたものであって、以下の構成を提供する。

〔1〕 以下の性質を備えるAMPデアミナーゼ：

- (1) 5'-アデニル酸+H₂O → 5'-イノシン酸+NH₃の反応を触媒する；
- (2) 65℃以下の温度で安定である（酢酸緩衝液（pH5.6）中）；
- (3) 分子量が48,000 ±2,000(ゲルろ過による)、60,000 ±3,000 (SDS-PAGEによる) である；
- (4) 至適pHが5.6付近にある（マッキュールバイン (McIlvaine) 緩衝液中）；

〔2〕 以下の性質を備える放線菌由来のAMPデアミナーゼ：

- (1) 5'-アデニル酸+H₂O → 5'-イノシン酸+NH₃の反応を触媒する；

50

(2)65℃以下の温度で安定である（酢酸緩衝液（pH5.6）中）。

〔3〕 前記放線菌が、ストレプトマイセス属に属する放線菌である、〔2〕に記載のAMPデアミナーゼ。

〔4〕 前記放線菌が、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)、ストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*)、及びストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) からなる群より選択される放線菌である、〔2〕に記載のAMPデアミナーゼ。

〔5〕 〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のAMPデアミナーゼを作用させるステップ、を含んでなる、酵母エキスの製造方法。

〔6〕 5'-ヌクレオチドに〔1〕～〔4〕のいずれかに記載のAMPデアミナーゼを作用させ、該5'-ヌクレオチドを脱アミド化してなる呈味物質の製造方法。

〔7〕 ストレプトマイセス属に属する放線菌を栄養培地で培養し、培養液中に〔1〕記載のAMPデアミナーゼを生成せしめ、これを採取することを特徴とするAMPデアミナーゼの製造方法。

〔8〕 前記放線菌が、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)、ストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*)、及びストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) からなる群より選択される放線菌である、〔7〕に記載の製造方法。

〔9〕 以下の(a)又は(b)からなる単離されたAMPデアミナーゼ：

(a)配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質；

(b)配列番号：1のアミノ酸配列の一部を改変したアミノ酸配列を有し、AMPデアミナーゼとして機能するタンパク質。

〔10〕 〔9〕に記載のAMPデアミナーゼをコードする単離された核酸分子。

〔11〕 以下の(a)～(c)のいずれかの塩基配列を有する、〔10〕に記載の単離された核酸分子：

(a)配列番号：3～5のいずれかの塩基配列；

(b)(a)の塩基配列の一部が改変されてなる塩基配列であって、AMPデアミナーゼとして機能するタンパク質をコードする塩基配列；

(c)(a)又は(b)の塩基配列と相補的な塩基配列に対してストリンジェントな条件下でハイブリダイズする塩基配列であって、AMPデアミナーゼとして機能するタンパク質をコードする塩基配列。

〔12〕 〔9〕～〔11〕のいずれかに記載の核酸分子を保持するベクター。

〔13〕 〔9〕～〔11〕のいずれかに記載の核酸分子が導入されている形質転換体。

〔14〕 以下の(1)及び(2)のステップを含む、AMPデアミナーゼの生産方法：

(1)〔13〕に記載の形質転換体を、前記核酸分子のコードするタンパク質を産生可能な条件下で培養するステップ；及び

(2)産生されたタンパク質を回収するステップ。

【発明の効果】

【0006】

本発明のAMPデアミナーゼは熱安定性に優れ、比較的高温の条件下で作用することが可能である。従って、酵素反応を雑菌汚染のおそれの少ない状況下で実施することが可能となる。また、例えば酵母エキスの製造過程において使用するヌクレアーゼなど、高温下で作用させる他の酵素と同時に作用させることができ、製造工程の簡略化及び短縮化を図れる。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】図1は、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が生産するAMPデアミナーゼの熱安定性を比較したグラフである。横軸は反応温度、縦軸は残存デアミナーゼ活性(%)である。

【図2】図2は、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマ

10

20

30

40

50

イセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が生産するAMPデアミナーゼについて、ホスファターゼ活性/デアミナーゼ活性 (P/D) を比較した表である。

【図3】図3は、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が生産するAMPデアミナーゼについて、IMP変換率を比較したグラフである。

【図4】図4は、酵母エキスの製造工程においてストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼを作用させた場合のIMP変換率を示すグラフである。(a)は、現行の製造方法と同様にヌクレアーゼ処理とデアミナーゼ処理を別々の工程とした場合の測定結果である。(b)は、ヌクレアーゼ処理とデアミナーゼ処理を同時に行った場合の結果である。

10

【図5】図5は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの精製過程におけるクロマトグラフィーの結果を示すグラフである。(a)はHiPrepTM16/10 ButylFFによるクロマトグラフィーの結果であり、(b)はSuperose 12によるクロマトグラフィーの結果である。

【図6】図6(a)は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの精製過程における全酵素活性量、全タンパク質量、比活性、及び収率をまとめた表である。図6(b)は、精製酵素をSDS-PAGE (CBB染色) で分析した結果を表す。レーンIIがサンプルレーン (精製酵素) である。レーンIにはタンパク質分子量マーカーのバンドが示される。高分子量側から順にフォスフォリラーゼb(M.W. 97,400)、牛血清アルブミン(M.W. 66,267)、アルドラーゼ(M.W. 42,400)、カルボニックアンヒドラーゼ(M.W. 30,000)、トリプシンインヒビター(M.W. 20,100)、リゾチーム(M.W. 14,400)のバンドである。

20

【図7】図7(a)は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼについて、反応温度と活性の関係を示すグラフである。65℃で反応させたときの活性値を100%とした場合の相対活性(%)を表した。図7(b)は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの熱安定性を示すグラフである。

【図8】図8(a)は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼについて、pHと活性の関係を示すグラフである。pH5.6で反応させたときの活性値を100%とした場合の相対活性を表した。図8(b)は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼのpH安定性を示すグラフである。

30

【図9】図9は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの基質特異性をまとめた表である。AMPに対する酵素活性を100%とした場合の相対活性を表している。

【図10】図10は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼをクロマトフォーカシングで分析した結果のグラフである。

【図11】図11は、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの諸性質をまとめた表である。比較のために、ペニシリウム・シトリナム (*Penicillium citrinum*) 由来ヌクレアーゼ及びアスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来AMPデアミナーゼの至適pH等も示される。

40

【図12】図12は、ストレプトマイセス・グリセウス サブエスピー グリセウス (*Streptomyces griseus* subsp. *griseus*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、及びストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*) が生産するAMPデアミナーゼの熱安定性及び基質特異性を比較した表である。

【図13】ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼのN末端アミノ酸配列及び内部アミノ酸配列を解析した結果である。

【図14】ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの制限酵素地図である。

【図15】シャトルベクターpSV1の構築フローを示す図である。

【図16】AMPデアミナーゼ発現用ベクターpSVSADの構築フローを示す図である。

50

【図17】AMPデアミナーゼ遺伝子が導入された形質転換体SAD-1が産生するAMPデアミナーゼの活性を測定した結果を示す表である。表中のNDは「検出されず」を表す。

【図18】図18は形質転換体（SAD-1）が生産するAMPデアミナーゼの熱安定性を示すグラフである。横軸は反応温度、縦軸は残存デアミナーゼ活性（%）である。

【図19】図19は、形質転換体（SAD-1）由来AMPデアミナーゼの基質特異性をまとめた表である。AMPに対する酵素活性を100%とした場合の相対活性を表している。

【図20】図20は、形質転換体（SAD-1）由来AMPデアミナーゼをSDS-PAGE（CBB染色）で分析した結果を表す。レーンIIがコントロールサンプルレーン（宿主培養上清）、レーンIIIがサンプルレーン（形質転換体培養上清）である。レーンIにはタンパク質分子量マーカーのバンドが示される。高分子量側から順にフォスフォリラーゼb(M.W. 97,000)、牛血清アルブミン(M.W. 66,000)、オボアルブミン(M.W. 45,000)、カルボニックアンヒドラーゼ(M.W. 30,000)、トリプシンインヒビター(M.W. 20,100)のバンドである。

10

【図21】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼのアミノ酸配列、及びそれをコードする配列（プロモーター領域及びターミネーター領域を含む）を示す図である。

【図22】図21の続き。

【図23】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼのアミノ酸配列（シグナルペプチドを含まない）である。

【図24】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼのアミノ酸配列（シグナルペプチドを含む）である。

【図25】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼをコードする配列（プロモーター領域及びターミネーター領域を含む）である。

20

【図26】図25の続き。

【図27】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼをコードする遺伝子のプロモーター領域の配列である。

【図28】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼの構造遺伝子の配列である。

【図29】同定に成功した放線菌由来AMPデアミナーゼをコードする遺伝子のターミネーター領域の配列である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の第1の局面はAMPデアミナーゼに関する。本発明のAMPデアミナーゼは放線菌に由来する。本発明のAMPデアミナーゼの由来は、放線菌の特定の種に限定されるものではない。本発明者らの検討の結果、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) を始めとしてストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*) やストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) が生産するAMPデアミナーゼも高い耐熱性を備えることが判明した。

30

【0009】

本発明のAMPデアミナーゼは、次の反応： $5' \text{-アデニル酸} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5' \text{-イノシン酸} + \text{NH}_3$ を触媒する（性質(1)）。このように、本発明のAMPデアミナーゼは5'-アデニル酸（AMP）に作用する。後述の実施例に示すように、本発明の一実施態様である、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来のAMPデアミナーゼは5'-dAMP（5'-デオキシアデニル酸）、ADP（アデノシン5'-二リン酸）、ATP（アデノシン5'-三リン酸）にも良好に作用する。従って、AMPを基質とする反応のみならず、これらのいずれかを基質とする反応に対しても本発明のAMPデアミナーゼを適用することができる。

40

一方、本発明のAMPデアミナーゼは熱安定性に優れ、65℃以下の温度で安定である（性質(2)）。ここで、「65℃以下の温度で安定である」とは、酢酸緩衝液でpH5.6に調整した酵素溶液を65℃で30分処理したときに、未処理の場合の酵素活性を基準（100%）として5%以上、好ましくは10%以上、更に好ましくは30%以上、より一層好ましくは50%以上、最も好ましくは90%以上の活性が残存することをいう（65℃よりも低い温度条件で同様に処理したときには通常、残存活性はより多くなる）。このように優れた熱安定性を備えることによって、本発明のAMPデアミナーゼは高温下（例えば60℃、65℃、70℃）で良好に作用

50

することが可能となる。

後述の実施例に示すように、本発明者らは以上の性質を備えるAMPデアミナーゼの一つとしてストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)が生産する酵素を見出し、これを精製することに成功した。得られたAMPデアミナーゼを詳細に検討したところ、以下の性質を備えることが明らかとなった。

(3)ゲルろ過による分子量が48,000 ±2,000である。尚、SDS-PAGEによる分子量は、60,000±3,000である。

(4)至適pHが5.6付近にある (マッキュルバイン (McIlvaine) 緩衝液中)

(5)作用pHが約4.5〜約8.5である (マッキュルバイン (McIlvaine) 緩衝液中)

(6)安定pHが約6.0〜約8.5である (マッキュルバイン (McIlvaine) 緩衝液中)

(7)反応温度が約40℃〜約70℃である (酢酸緩衝液 (pH5.6) 中)

(8)至適温度が65℃付近にある (酢酸緩衝液 (pH5.6) 中)

(9)温度安定性が65℃以下で安定である (酢酸緩衝液 (pH5.6) 中)

作用pHの範囲は、至適pHでのAMPデアミナーゼ活性を基準 (100%) としたときの相対活性が約50%以上の範囲としている。一方、安定pHの範囲は、未処理、至適pHでのAMPデアミナーゼ活性を基準 (100%) としたときの残存活性が約50%以上の範囲としている。

熱安定性に関しては、酢酸緩衝液でpH5.6に調整した酵素溶液を65℃で30分処理したときに、未処理の場合の酵素活性を基準 (100%) として約90%の残存活性が認められた。処理温度を70℃に上昇させても、約55%の活性を保持していた。

又、反応温度の範囲は、至適温度でのAMPデアミナーゼ活性を基準 (100%) としたときの相対活性が約70%以上の範囲としている。

一方、基質特異性について調べたところ、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)由来のAMPデアミナーゼは3'-AMP、5'-dAMP、ADP、ATP、Adenosine (アデノシン)、及びcAMP (サイクリックアデノシン3', 5'-リン酸) にも作用する一方で、2'-AMP、adenine (アデニン)、5'-GMP、5'-UMP、及び5'-CMPには作用しないことが明らかとなった。特に、5'-dAMP、ADP、ATPに対して良好に作用することが認められた。アデノシンに対する作用は弱く、5'-AMPに対する作用の1/10以下であった。

また、ホスファターゼ活性は検出されなかった。これに対してアスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*)に由来する従来のAMPデアミナーゼでは、夾雑ホスファターゼ活性が検出される。このように、夾雑ホスファターゼ活性が極めて少ないという点において、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)由来のAMPデアミナーゼは従来のAMPデアミナーゼと顕著に相違する。

ホスファターゼが夾雑すると、5'-AMPよりAMPデアミナーゼ作用によって生成された呈味成分のイノシン酸が、さらにイノシンにまで分解されて呈味性がなくなってしまう故、夾雑ホスファターゼの極めて少ないストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)由来のAMPデアミナーゼは産業上有益である。

結局のところ、以上の性質(3)〜(8)、熱安定性、基質特異性、及び夾雑ホスファターゼが極めて少ないこと等の特徴をストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)由来のAMPデアミナーゼは有する。

尚、熱安定性試験などの各種試験におけるAMPデアミナーゼ活性は原則として、後述の実施例に示す方法 (デアミナーゼ活性測定方法) で測定するものとする。

【0010】

本発明の第2の局面はAMPデアミナーゼの製造方法 (調製方法) に関し、以下のステップを含むことを特徴とする。

a) ストレプトマイセス属に属する放線菌を培養する培養ステップ。

b) 前記培養ステップ後の培養液からAMPデアミナーゼを精製する精製ステップ。

ステップaで使用する放線菌は、熱安定性に優れるAMPデアミナーゼを生産すると予想されるものであればその種類は特に問わない。例えば、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)、ストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*) 又はストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) を使用することが

10

20

30

40

50

できる。放線菌の培養は常法で行うことができる。培地にはグルコース、シュクロース、ゲンチオビオース、可溶性デンプン、グリセリン、デキストリン、糖蜜、有機酸等の炭素源、硫酸アンモニウム、炭酸アンモニウム、リン酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、あるいは、ペプトン、酵母エキス、コーンステープリカー、カゼイン加水分解物、ふすま、肉エキス等の窒素源、及び必要に応じてカリウム塩、マグネシウム塩、ナトリウム塩、リン酸塩、マンガン塩、鉄塩、亜鉛塩等の無機塩化物（無機イオン）を含むものを用いることができる。放線菌の生育を促進するために、ビタミン、アミノ酸などを添加した培地を用いることもできる。培地のpHは例えば5.0～8.0、好ましくは5.5～7.5に調整する。培養温度は例えば15℃～50℃の範囲であり、好ましくは20℃～40℃の範囲であり、更に好ましくは25℃～35℃の範囲である。培養時間は特に限定されないが、例えば1日以上、3日以上、5日以上である。培養法としては例えば振盪培養法、ジャーファーマンターによる好氣的深部培養法を利用できる。

10

上述した各種の培養条件などは培養する対象に応じて適宜変更され、本発明のAMPデアミナーゼが生産される条件であれば、その条件等は限定されない。

【0011】

放線菌を所望時間培養した後の培養液又は菌体よりAMPデアミナーゼを回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことによりAMPデアミナーゼを得ることができる。好ましくは、硫酸沈殿等の塩析による分画の後、疎水性クロマトグラフィー及びゲルろ過を行う。

20

他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことによりAMPデアミナーゼを得ることができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程（菌体の破碎、分離、精製）を行ってもよい。

尚、各精製工程では原則としてAMPデアミナーゼ活性を指標として分画を行い、次のステップへと進む。

【0012】

本発明の第3の局面は、上記本発明のAMPデアミナーゼの利用に関する。本発明のAMPデアミナーゼは、通常のAMPデアミナーゼ（即ち、これまでに利用されている、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 等に由来するAMPデアミナーゼ）と同様に様々な用途に利用される。但し、耐熱性に優れるという特徴を活かして、高温下での反応が好ましい用途において好適に利用され得る。ここでの「高温下での反応が好ましい用途」とは、製造効率や雑菌汚染などの観点からAMPデアミナーゼを高温下で反応させることが好ましい用途のことをいう。当該用途の具体例として酵母エキスの製造を挙げることができる。酵母エキスの製造においては一般にヌクレアーゼ処理とAMPデアミナーゼ処理によって旨味増強（味質改善）が行われる。熱安定性に優れる本発明のAMPデアミナーゼを使用すれば、高温下で実施されるヌクレアーゼ処理と同時にAMPデアミナーゼ処理を行うことができる。これによって、製造工程の簡略化及び短縮化が達成されるとともに、酵素処理中の雑菌汚染を有効に防止できる。

30

本発明のAMPデアミナーゼを利用した酵母エキスの製造方法では、好ましい一態様として、次のステップ、即ち酵母溶菌液に対してヌクレアーゼとAMPデアミナーゼを添加し、高温下で作用させるステップを実施する。酵母溶菌液は常法で調製することができる。例えば、10%ビール酵母又はパン酵母等の懸濁液（pH7.0）に加熱処理を行い、市販の溶菌酵素であるYL-NL「アマノ」又はYL-15（いずれも天野エンザイム社製品）を添加して溶菌させることによって酵母溶菌液を調製する。ヌクレアーゼは様々なメーカー（例えば天野エンザイム社）によって市販されており、その中から好適なものを適宜選択して用いることができる。微生物などから常法で調製したヌクレアーゼを使用してもよい。複数種類のヌクレアーゼを併用してもよい。ヌクレアーゼとAMPデアミナーゼの添加量は、使用する酵素の種類や活性値を考慮して適宜設定することができる。作用温度はヌクレアーゼとAMPデアミナーゼがともに作用する温度とする。例えば60℃～80℃、好ましくは65℃～75℃、

40

50

更に好ましくは約70℃で反応させる。

【0013】

(単離されたAMPデアミナーゼ)

後述の実施例に示すように、本発明者らはストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼのアミノ酸配列及びそれをコードする遺伝子の配列を同定することに成功した。これによってAMPデアミナーゼを組み換え体として生産することが可能となった。

本発明の更なる局面は以上の成果に基づき、単離されたAMPデアミナーゼに関する。本発明のAMPデアミナーゼは例えば配列番号：1のアミノ酸配列を有するタンパク質からなる。後述の実施例で示されるように、当該タンパク質については実際にAMPデアミナーゼ活性を示すことが確認されている。尚、シグナルペプチドを含む配列を配列番号：2に示す。

10

【0014】

本発明の一態様では、配列番号：1又は2のアミノ酸配列を有するタンパク質と比較した場合にその機能は同等であるものの一部においてアミノ酸配列が相違するタンパク質（以下、「相同タンパク質」ともいう）からなるAMPデアミナーゼが提供される。「一部においてアミノ酸配列が相違する」とは、典型的には、アミノ酸配列を構成する1～数個のアミノ酸の欠失、置換、若しくは1～数個のアミノ酸の付加、挿入、又はこれらの組合せによりアミノ酸配列に変異（変化）が生じていることをいう。ここでのアミノ酸配列の相違は、AMPデアミナーゼとしての機能、即ち5'-アデニル酸+H₂O → 5'-イノシン酸+NH₃の反応を触媒するという機能（「AMPデアミナーゼ活性」ともいう）が保持される限り許容される。この条件を満たす限りアミノ酸配列が相違する位置は特に限定されず、また複数の位置で相違が生じていてもよい。ここでの複数とは例えば全アミノ酸の約30%未満に相当する数であり、好ましくは約20%未満に相当する数であり、さらに好ましくは約10%未満に相当する数であり、より一層好ましくは約5%未満に相当する数であり、最も好ましくは約1%未満に相当する数である。即ち相同タンパク質は、配列番号：1又は2のアミノ酸配列と例えば約70%以上、好ましくは約80%以上、さらに好ましくは約90%以上、より一層好ましくは約95%以上、最も好ましくは約99%以上の同一性を有する。

20

好ましくは、保存的アミノ酸置換を非必須アミノ酸残基（「AMPデアミナーゼ活性に関与しないアミノ酸残基」）に生じさせることによって相同タンパク質を得る。ここでの「保存的アミノ酸置換」とは、あるアミノ酸残基を、同様の性質の側鎖を有するアミノ酸残基に置換することをいう。アミノ酸残基はその側鎖によって塩基性側鎖（例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えばアスパルギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分岐側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）、芳香族側鎖（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）のように、いくつかのファミリーに分類されている。保存的アミノ酸置換は好ましくは、同一のファミリー内のアミノ酸残基間の置換である。

30

【0015】

ここで、二つのアミノ酸配列又は二つの核酸（以下、これらを含む用語として「二つの配列」を使用する）の同一性（%）は例えば以下の手順で決定することができる。まず、最適な比較ができるよう二つの配列を並べる（例えば、第一の配列にギャップを導入して第二の配列とのアライメントを最適化してもよい）。第一の配列の特定位置の分子（アミノ酸残基又はヌクレオチド）が、第二の配列における対応する位置の分子と同じであるとき、その位置の分子が同一であるという。二つの配列の同一性は、その二つの配列に共通する同一位置の数の関数であり（すなわち、同一性（%）＝同一位置の数／位置の総数×100）、好ましくは、アライメントの最適化に要したギャップの数およびサイズも考慮に入れる。

40

二つの配列の比較及び同一性の決定は数学的アルゴリズムを用いて実現可能である。配列の比較に利用可能な数学的アルゴリズムの具体例としては、KarlinおよびAltschul (19

50

90) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68に記載され、KarlinおよびAltschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77において改変されたアルゴリズムがあるが、これに限定されることはない。このようなアルゴリズムは、Altschulら (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10に記載のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）に組み込まれている。本発明の核酸に相同的なヌクレオチド配列を得るには例えば、NBLASTプログラムでscore = 100、wordlength = 12としてBLASTヌクレオチド検索を行えばよい。本発明のタンパク質に相同的なアミノ酸配列を得るには例えば、XBLASTプログラムでscore = 50、wordlength = 3としてBLASTポリペプチド検索を行えばよい。比較のためのギャップアライメントを得るためには、Altschulら (1997) Amino Acids Research 25(17): 3389-3402に記載のGapped BLASTが利用可能である。BLASTおよびGapped BLASTを利用する場合は、対応するプログラム（例えばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータを使用することができる。詳しくは<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。配列の比較に利用可能な他の数学的アルゴリズムの例としては、MyersおよびMiller (1988) Comput Appl Biosci. 4:11-17に記載のアルゴリズムがある。このようなアルゴリズムは、例えばGENESTREAMネットワークサーバー（IGH Montpellier、フランス）またはISRECサーバーで利用可能なALIGNプログラムに組み込まれている。アミノ酸配列の比較にALIGNプログラムを利用する場合は例えば、PAM120残基質量表を使用し、ギャップ長ペナルティ=12、ギャップペナルティ=4とすることができる。

10

二つのアミノ酸配列の同一性を、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラムを用いて、Blossom 62マトリックスまたはPAM250マトリックスを使用し、ギャップ加重=12、10、8、6、又は4、ギャップ長加重=2、3、又は4として決定することができる。また、二つの核酸配列の相同度を、GCGソフトウェアパッケージ（<http://www.gcg.com>で利用可能）のGAPプログラムを用いて、ギャップ加重=50、ギャップ長加重=3として決定することができる。

20

【0016】

本発明のAMPデアミナーゼ（相同タンパク質を含む）の中で天然の放線菌が有するものについては、当該放線菌より抽出、精製等の操作によって調製することができる。また、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を基にして遺伝子工学的手法を用いて本発明のAMPデアミナーゼ（相同タンパク質を含む）を調製することもできる。例えば、本発明のAMPデアミナーゼをコードするDNAで適当な宿主細胞を形質転換し、形質転換体が発現したタンパク質を回収することにより調製することができる。回収されたタンパク質は目的に応じて適宜精製される。組換えタンパク質として調製する場合には種々の修飾が可能である。例えば、本発明のAMPデアミナーゼをコードするDNAと他の適当なDNAとを同じベクターに挿入し、当該ベクターを用いて組換えタンパク質の生産を行えば、本発明のAMPデアミナーゼに他のペプチドないしタンパク質が連結された組換えタンパク質を得ることができる。また、糖鎖及び／又は脂質の付加や、あるいはN末端若しくはC末端のプロセッシングが生ずるような修飾を施してもよい。以上のような修飾により、組換えタンパク質の抽出、精製の簡便化、又は生物学的機能の付加等が可能である。

30

【0017】

ここで、本発明のAMPデアミナーゼに関して使用する場合の「単離された」とは、その本来の環境（例えば天然の物質の場合は天然の環境）から取り出された状態、即ち、人為的操作によって、本来の存在状態と異なる状態で存在していることをいう。

40

単離された状態のAMPデアミナーゼは通常、産生菌の菌体成分を含まない。また夾雑成分（夾雑タンパク質、組換えDNA技術によって生産する場合の宿主に由来する他の成分、培養液成分等）の含有量は少ないことが好ましい。本発明の単離されたAMPデアミナーゼでは夾雑タンパク質の量が例えば全タンパク質量の50%以下、好ましくは40%以下、更に好ましくは30%以下、より一層好ましくは20%以下である。

【0018】

（AMPデアミナーゼをコードする核酸分子）

本発明の更なる局面は、AMPデアミナーゼをコードする核酸分子に関する。

50

本明細書における用語「核酸」は、DNA（cDNA及びゲノムDNAを含む）、RNA（mRNAを含む）、DNA類似体、及びRNA類似体を含む。本発明の核酸の形態は限定されず、即ち1本鎖及び2本鎖のいずれであってもよい。好ましくは2本鎖DNAである。またコドンの縮重も考慮される。即ち、その発現産物として目的のタンパク質が得られる限り任意の塩基配列を有してよい。

【0019】

本明細書において「特定のタンパク質をコードする核酸」とは、それを発現させた場合に当該特定のタンパク質が得られる核酸のことをいい、当該タンパク質のアミノ酸配列に対応する塩基配列を有する核酸は勿論のこと、そのような核酸にアミノ酸配列をコードしない配列が付加されてなる核酸（例えば1又は複数個のイントロンを含むDNA）をも含む。

10

【0020】

本明細書において用語「単離された核酸」とは、もともと天然に存在している核酸の場合、典型的には、天然状態において共存するその他の核酸から分離された状態の核酸をいう。但し、天然状態において隣接する核酸配列など一部の他の核酸成分を含んでいてもよい。

【0021】

例えばcDNA分子など遺伝子組み換え技術によって生産される核酸の場合の「単離された核酸」は好ましくは、細胞成分や培養液などを実質的に含まない状態の核酸をいう。同様に、化学合成によって生産される核酸の場合の「単離された核酸」は好ましくは、dNTPなどの前駆体（原材料）や合成過程で使用される化学物質等を実質的に含まない状態の核酸をいう。

20

核酸がベクターや組成物の一部として存在していても又は外来性分子として細胞内に存在していても、人為的操作の結果として存在している限り「単離された核酸」である。

尚、特に言及しない限り、本明細書において単に「核酸」と記載した場合には、単離された状態の核酸を意味する。

【0022】

本発明の核酸分子は上記本発明のAMPデアミナーゼをコードする。即ち本発明の核酸分子は、配列番号：1又は2のアミノ酸配列を有するタンパク質又はその相同タンパク質をコードする。本発明の核酸分子の具体的一態様は、配列番号：3の塩基配列を有するDNAである。この塩基配列は、同定に成功したAMPデアミナーゼ遺伝子をコードするDNAであって5'非翻訳領域（プロモーター領域）及び3'非翻訳領域（ターミネーター領域）を含む。このようなDNAではプロモーター及びターミネーターと構造遺伝子が本来の組合せ（天然状態の組合せ）となることから、当該DNAを利用したAMPデアミナーゼ生産を行えば良好な遺伝子発現を期待できる。したがって、効率的なAMPデアミナーゼ生産系を構築できる。

30

本発明の他の態様は、配列番号：3の塩基配列から、その5'非翻訳領域又はその一部、及び3'非翻訳領域又はその一部のいずれか一つ以上が欠失したDNAを提供する。かかるDNAの具体例としては、配列番号：4又は5の塩基配列を有するDNAを挙げることができる。配列番号：4の塩基配列を有するDNAは、同定に成功したAMPデアミナーゼの構造遺伝子（シグナルペプチドをコードする領域を含む）をコードするDNAである。同様に、配列番号：5の塩基配列を有するDNAは、同定に成功したAMPデアミナーゼの構造遺伝子（シグナルペプチドをコードする領域を含まない）をコードするDNAである。

40

【0023】

本発明の核酸は、本明細書又は添付の配列表が開示する配列情報を参考にし、標準的な遺伝子工学的手法、分子生物学的手法、生化学的手法などを用いることによって、単離された状態に調製することができる。

例えば、本発明の核酸は、当該核酸の塩基配列又はその相補配列の全体又は一部をプローブとしたハイブリダイゼーション法を利用して放線菌ゲノムDNAライブラリーより単離することができる。また、当該核酸の塩基配列の一部に特異的にハイブリダイズするよう

50

にデザインされた合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いた核酸増幅反応（例えばPCR）を利用して放線菌ゲノムDNAライブラリー又は放線菌ゲノム、或いは放線菌核酸抽出物より増幅及び単離することができる。尚、オリゴヌクレオチドプライマーは一般に、市販の自動化DNA合成装置などを用いて容易に合成することができる

使用するライブラリーの種類に応じてプラークハイブリダイゼーション法あるいはコロニーハイブリダイゼーション法などが利用される（Molecular Cloning, Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York等を参照）。例えばプラスミドを用いて構築されたライブラリーの場合を例に採ればコロニーハイブリダイゼーション法が利用される。目的の核酸を保有するクローンの選択には、本発明の核酸に特異的な配列を有するプローブが用いられる。目的とするクローンが選択されれば、このクローンが保有する核酸を鋳型とし、目的の核酸の配列に特異的なプライマーを用いたPCR法等を実施することにより、本発明の核酸を増幅産物として得ることができる。

10

得られたクローンが保有する核酸を適当なベクターにサブクロニングして以降の利用に供することができる。これによって例えば、形質転換用の組換えベクターの構築や、或は塩基配列解読に適したプラスミドの構築ができる。

【0024】

本発明の他の態様では、配列番号：3～5のいずれかの塩基配列と比較した場合にそれがコードするタンパク質の機能は同等であるものの一部において塩基配列が相違する核酸（以下、「相同核酸」ともいう）が提供される。相同核酸の例として、配列番号：3～5の塩基配列を基準として1若しくは複数の塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含む塩基配列からなり、かつAMPデアミナーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNAを挙げることができる。塩基の置換や欠失などは複数の部位に生じていてもよい。ここでの「複数」とは、当該核酸がコードするタンパク質の立体構造におけるアミノ酸残基の位置や種類によっても異なるが例えば2～40塩基、好ましくは2～20塩基、より好ましくは2～10塩基である。

20

上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等の変異にはAMPデアミナーゼ遺伝子を保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合など、天然に生じる変異も含まれる。

相同核酸の他の例として、SNPに代表される多型に起因して上記のごとき塩基の相違が認められる核酸を挙げることができる。

30

【0025】

以上のような相同核酸は例えば、制限酵素処理、エキソヌクレアーゼやDNAリガーゼ等による処理、位置指定突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）やランダム突然変異導入法（Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York）による変異の導入などによって得られる。また、紫外線照射など他の方法によっても相同核酸を得ることができる。さらには、AMPデアミナーゼ遺伝子を保有する放線菌を紫外線で処理し、その後改変された遺伝子を単離することなど、公知の変異処理を利用した方法によっても取得することができる。

【0026】

40

相同核酸の調製方法の具体例を以下に示す。相同核酸を保有する天然の放線菌からゲノム（染色体）DNAを抽出し、これを適当な制限酵素で処理した後に本発明の核酸分子（例えば配列番号：3の塩基配列を有するDNA）又はその一部をプローブとしたスクリーニングにおいてストリンジントな条件でハイブリダイズするDNAを選択、単離する。相同核酸を保有するクローンを含むゲノム（染色体）DNAライブラリーを利用可能な場合には、当該ライブラリーを本発明の核酸分子（例えば配列番号：3の塩基配列を有するDNA）又はその一部をプローブとしてストリンジントな条件下でスクリーニングすることによっても得ることができる。

【0027】

本発明の他の態様は、配列番号：3～5の塩基配列に対して相補的な塩基配列を有する

50

核酸に関する。

本発明の更に他の態様は、配列番号：3～5の塩基配列、或いはこれらいずれかに相補的な塩基配列に対して少なくとも約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または99.9%同一な塩基配列を有する核酸を提供する。尚、同一性はできるだけ高い方が好ましい。

本発明の更に別の態様は、配列番号：3～5の塩基配列又はその相同塩基配列に相補的な塩基配列に対してストリンジントな条件下でハイブリダイズする塩基配列を有する核酸に関する。ここでの「ストリンジントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。このようなストリンジントな条件は当業者に公知であって例えばMolecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor

Laboratory Press, New York)やCurrent protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987)を参照して設定することができる。

【0028】

(ベクター)

本発明のさらに他の局面は、本発明の核酸を含有するベクターに関する。本明細書において用語「ベクター」は、それに挿入された核酸を細胞等のターゲット内へと輸送することができる核酸性分子をいう。

本発明のベクターは、既存のベクター又はそれに改変を施したベクター内に本発明の核酸（典型的にはDNA）を組込むことにより作製することができる。本発明の核酸を保持し得るものであれば原則としていかなるベクターを出発材料としてもいが、使用目的（クローニング、ポリペプチドの発現）に応じて、また宿主細胞の種類を考慮して適当なベクターが選択される。

【0029】

形質転換用のベクターには、典型的には、AMPデアミナーゼ遺伝子（例えば配列番号：4の塩基配列を有するDNA）、プロモーター、およびターミネーターが含有される。プロモーターによる構造遺伝子の適切な転写が達成されるように、上流から下流に向かって順にプロモーター、AMPデアミナーゼ遺伝子、及びターミネーターが配置される。

本発明のベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」とは、それに挿入された核酸を目的の細胞（宿主細胞）内に導入することができ、且つ当該細胞内において発現させることが可能なベクターをいう。発現ベクターは通常、核酸の発現に必要なプロモーター配列や、発現を促進させるエンハンサー配列等を含む。選択マーカーを含む発現ベクターを使用することもできる。かかる発現ベクターを用いた場合には、選択マーカーを利用して発現ベクターの導入の有無（及びその程度）を確認することができる。

本発明の核酸のベクターへの挿入、選択マーカー遺伝子の挿入（必要な場合）、プロモーターの挿入（必要な場合）等は標準的な組換えDNA技術（例えば、Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkを参照することができる、制限酵素及びDNAリガーゼを用いた周知の方法）を用いて行うことができる。尚、プロモーター領域をも含むDNA（例えば配列番号：3の塩基配列を有するDNA）を保持するベクターを構築する場合には、当該DNAのプロモーター領域とその他の領域とを別個に用意し、それぞれをベクターに組込むことにより組換えベクターを構築してもよい。このような場合には、プロモーター機能が適切に発揮されることを条件として、ベクター内において両者（プロモーター領域とその他の領域）の間に他の配列が介在していてもよい。また、まずプロモーター領域を保持するベクターを構築し、その後その他の領域の連結を行ってもよい。

以上の組換えベクターは宿主の形質転換に利用される。即ち、以上の組換えベクターを用いて、本発明の核酸分子が導入された形質転換体を調製することができる。

【0030】

(形質転換体及びその利用)

形質転換用ベクターは宿主の形質転換に利用される。即ち、上記の形質転換用ベクター

を用いて、本発明の核酸分子が導入された形質転換体を調製することができる。

形質転換に供される宿主の種類は特に限定されず、ストレプトマイセス・ミュリナス (IF014802等)、ストレプトマイセス・リビダンス (TK24等)、ストレプトマイセス・グリセウス サブエスピー グリセウス (*Streptomyces griseus* subsp. *griseus*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、ストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*)、ストレプトマイセス・セリカラー (*Streptomyces coelicolor*)、ストレプトマイセス・モバラエンシス (*Streptomyces mobaraensis*)、ストレプトロマイセス・アベルミチリス (*Streptomyces avermitilis*) 等の放線菌を宿主として好適に用いることができる。その他、エスケリッチア・コライ (*Escherichia coli*)、バシラス・サチルス (*Bacillus subtilis*)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、サッカロマイセス・ポンベ (*Saccharomyces pombe*) 等を宿主として採用することもできる。

10

【0031】

形質転換用ベクターの宿主への導入 (形質転換) は公知の方法で行うことができる。例えば、プロトプラスト化した菌体を用いたD.A. Hopwoodらの方法 (PRACTICAL STREPTOMYCETES GENETICS P.229-252 (The John Innes Foundation, 2000)) により行うことができる。

【0032】

形質転換体はAMPデアミナーゼの生産に利用され得る。具体的には、本発明の核酸が導入された形質転換体を、当該核酸のコードするタンパク質 (AMPデアミナーゼ) が発現可能な条件で培養することにより、AMPデアミナーゼを産生させることができる。培地は使用する宿主に応じて適切なものが用いられる。例えば市販の各種培地又はこれらにプロリン、ロイシン、チアミン等の形質転換体の生育、選択、タンパク質の発現促進などに必要な成分を添加した培地を用いることができる。

20

【0033】

所望時間培養した後の培養液又は菌体より目的のタンパク質 (AMPデアミナーゼ) を回収することができる。菌体外に産生された場合には培養液より、それ以外であれば菌体内より回収することができる。培養液から回収する場合には、例えば培養上清をろ過、遠心処理して不溶物を除去した後、硫酸沈殿等の塩析、透析、各種クロマトグラフィーなどを組み合わせて分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。他方、菌体内から回収する場合には、例えば菌体を加圧処理、超音波処理などによって破碎した後、上記と同様に分離、精製を行うことにより目的のタンパク質を取得することができる。尚、ろ過、遠心処理などによって予め培養液から菌体を回収した後、上記一連の工程 (菌体の破碎、分離、精製) を行ってもよい。尚、本発明のAMPデアミナーゼは通常菌体外に産生されることから、その分離、精製は比較的容易である。

30

【0034】

以下、実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

【0035】

ストレプトマイセス・ミュリナス由来AMPデアミナーゼの精製

40

1. 実験方法及び材料

以下の実験に使用した菌株、酵素液の調製方法、及び酵素活性測定方法は次の通りとした。

<使用菌株>

ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802、ストレプトマイセス・グリセウス サブエスピー グリセウス (*Streptomyces griseus* subsp. *griseus*) JCM4681、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*) IF03355(NBRC3355)及びストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*) IF013780(NBRC13780)を使用した。尚、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF

50

014802は、以下の通り、国際寄託機関に寄託されている。

国際寄託機関

名称：独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター

住所：〒305-8566 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 中央第6

寄託日：2004年3月29日

寄託番号：FERM BP-08673

【0036】

＜酵素液の調製方法＞

(1)アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*)由来酵素液

市販のAMPデアミナーゼ剤である「デアミザイム (50,000 u/mg品)」(商標名、天野エンザイム社製品)を水で希釈し、酵素液とした。

10

(2)ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*)由来酵素液

ソルビーNY 2%、ミーストPIG 0.5%、NaCl 0.3%、 KH_2PO_4 0.1%、食添 MgSO_4 0.05%、可溶性デンプン 3%を加えてpH5.7に調整し、121℃で30分間殺菌を行った。ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802を植菌し、27℃で前培養を1日、本培養を5日間行ない粗酵素液を調製した。

(3)放線菌由来酵素液

ソーヤフラワーA 2%、NaCl 0.3%、 KH_2PO_4 0.1%、食添 MgSO_4 0.05%、可溶性デンプン 3%を加えてpH5.7に調整し、121℃で30分間殺菌を行った。植菌し、27℃で前培養を1日、本培養を5日間行ない粗酵素液を調製した。

20

【0037】

＜酵素活性測定方法＞

(1)AMPデアミナーゼ活性測定方法

反応時の OD_{265} の減少を指標として酵素活性を測定した。0.017Mの5' AMP-2Naと1/15Mリン酸塩緩衝液(pH 5.6)を1:2の割合で混合した溶液1.5mlに試料溶液0.5mlを添加して反応液とし、37℃で15分間反応させた。15分後に2%過塩素酸溶液を添加して反応を停止させた後、100 μl を量り取った。水を加えて5mlとして OD_{265} を測定した。反応時間を0分として同様に測定したものをブランクとした。以上の条件下、60分間に吸光度差が0.001減少するときを1単位とした。

(2)ホスファターゼ活性測定方法

30

0.025Mの5' IMP-2Naと0.036Mバルビタールナトリウム・塩酸緩衝液(pH 5.6)を1:2の割合で混合した溶液1.5mlに試料溶液0.5mlを添加して反応液として、37℃で30分間反応させた。反応終了後に200 μl を量りとり、5mlの6%過塩素酸で反応を停止させた。0.05Mのアミドール溶液0.25mlを入れて混ぜ合わせた後、0.067Mのモリブデン酸アンモニウム溶液を0.25ml入れて混ぜ合わせ、更に水を0.25ml入れて混ぜ合わせた。続いて流水中に15分間放置した後、 OD_{750} を測定した。反応時間を0分として同様に測定したものをブランクとした。以上の条件下、30分間に吸光度差が0.001増加したときを1単位とした。

【0038】

2. 実験結果

(1)熱安定性

40

アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が生産するAMPデアミナーゼの熱安定性を比較した。アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) について、上記の方法で調製した1%酵素溶液を所定の温度で処理した後、残存AMPデアミナーゼ活性を測定した (pH 5.6)。尚、処理温度は、30℃、40℃、50℃、60℃、65℃、70℃、及び75℃とした。また、処理時間は30分間とした。

測定結果を図1のグラフに示す。ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来のAMPデアミナーゼが熱安定性に非常に優れていることが分かる。

【0039】

(2)夾雑ホスファターゼ

50

アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) について、夾雑ホスファターゼ活性を測定した。測定結果から求めたホスファターゼ活性/デアミナーゼ活性 (P/D) を図2の表にまとめた。アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) では夾雑活性が存在することが分かった。一方、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) ではホスファターゼ活性は認められなかった。即ちストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が生産するAMPデアミナーゼは、夾雑ホスファターゼ活性が極めて低いものであることが明らかとなった。

【0040】

(3) IMP変換反応

アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 及びストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が生産するAMPデアミナーゼについて、HPLCによるIMP変換率を調べた。具体的には1/15Mリン酸緩衝液 (pH7.0) を用いて1.1%AMP溶液を調製し、1.1%AMP溶液5mlに対し、酵素溶液0.5mlを添加して50℃、4時間反応を行い、その後100℃、10分の加熱処理し、フィルターろ過 (0.45 μm) を行いHPLCによる分析を行った。

測定結果を図3のグラフに示す。ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) の生産するAMPデアミナーゼのIMP変換率 (変換速度) は、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来AMPデアミナーゼと同等であった。上記のように、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) では夾雑ホスファターゼ活性が認められなかったため副生産物の特定を行った。その結果、副生産物 (ヒポキサンチン) の割合はアスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) の場合よりも少なかった (結果を図示せず)。

【0041】

(4) 実用化試験

実際の酵母エキスの製造においてストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来のAMPデアミナーゼが有効であることを確認するために以下の試験 (試験1、試験2) を行った。

a) 試験1

試験1では、現行の製造方法と同様に、ヌクレアーゼ処理とデアミナーゼ処理を別々の工程とした。具体的には次の手順で処理し、IMP変換率を求めた。まず、酵母溶菌液 (YL-15、0.2%) にヌクレアーゼ「アマノ」G (天野エンザイム社製、0.1% w/w yeast solid、) を添加し、70℃、pH 5の条件で3時間反応させた。次に、被験酵素 (アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来のAMPデアミナーゼ剤の「デアミザイム (50,000 u/mg品)」 (商標名、天野エンザイム社製、0.01~0.04% w/w yeast solid) 又はストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) から調製した粗酵素溶液) を添加し、50℃、pH 6の条件で5時間反応させた。続いて熱処理した後、HPLC分析に供した。尚、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの添加量は、その活性値が「デアミザイム (50,000 u/mg品)」 (商標名、天野エンザイム社製) の添加量活性値と同じとなる量とした。

b) 試験2

試験2では、ヌクレアーゼ処理とデアミナーゼ処理を同時に行うこととした。具体的には次の手順で処理し、IMP変換率を求めた。まず、酵母溶菌液 (YL-15、0.2%) にヌクレアーゼ「アマノ」G (天野エンザイム社製、0.1% w/w yeast solid) 及び被験酵素 (アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*) 由来のAMPデアミナーゼ剤の「デアミザイム (50,000単位品)」 (商標名、天野エンザイム社製、0.01~0.04% w/w yeast solid) 又はストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) から調製した粗酵素溶液) を添加し、70℃、pH 5の条件で所定時間 (3時間又は5時間) 反応させた。続いて熱処理した後、HPLC分析に供した。尚、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの添加量は、その活性値がデアミザイム (50,000 u/mg品) の添加量活性値と同じとなる量とした。

【0042】

試験1の結果を図4(a)に示す。図4(a)から明らかなように、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼは、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*)由来のAMPデアミナーゼ (デアミザイム: 50,000u/mg品) と同等のIMP変換率を示した。

一方、試験2の結果を同図(b)に示す。グラフ中の3hrsは、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼを同時に3時間作用させたときの測定結果であり、5hrsは同様に5時間作用させたときの測定結果である。尚、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*)由来のAMPデアミナーゼ (デアミザイム: 50,000 u/mg品) を使用した場合 (3時間の反応及び5時間の反応のいずれにおいても) にはIMPの生成が認められなかった。図4(b)から明らかなように、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼを使用した場合には、ヌクレアーゼと同時に高温で作用させてもIMPの生成が認められた。このように、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来のAMPデアミナーゼはヌクレアーゼと同時に反応させることが可能であることが確認された。

【0043】

(5)ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの酵素学的諸性質

以下の手順でストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来のAMPデアミナーゼの精製を試みた。まず、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) (IF014802) を上記の方法で培養し、生産された酵素を限外ろ過膜 (A I P 1 0 1 0) による2倍濃縮し、濃縮液に水を加えて、更に濃縮して低分子画分を除去後、凍結乾燥して粗酵素とした。この粗酵素を精製水に溶解し、飽和硫安48%による硫安分画を行った。沈殿画分を20mM KPB(pH7.0)に溶解し酵素液とした。得られた酵素液を、30%硫安を含む20mM KPB(pH7.0)で平衡化を行ったHiPrep™16/10 ButylFF (ファルマシア製) に通した。続いて、硫安30%~0%を含む20mM KPB pH7.0、硫安30%~0%の濃度勾配で溶出させた。その後、濃縮を行い、活性画分をSuperose 12 column (ファルマシア製) によるゲルろ過に供し、150mMのNaClを含む50mM KPB pH7.0で溶出させた。活性画分 (画分15及び16) を集めて精製酵素とした。尚、HiPrep™16/10 ButylFFによるクロマトグラフィーの結果を図5(a)に示し、Superose 12によるクロマトグラフィーの結果を図5(b)に示す。また、各段階における全酵素活性量、全タンパク質量、比活性、及び収率を図6(a)の表に示す。最終段階の比活性は粗酵素に比較して96倍となった。

精製酵素をSDS-PAGE (CBB染色) に供し、タンパク質の純度を確認した。SDS-PAGEの結果を図6(b)に示す。レーンIIがサンプルレーン (精製酵素) である。単一なバンドを示し、精製酵素の純度が高いことがわかる。尚、レーンIにはタンパク質分子量マーカーのバンドが示される。高分子量側から順にフォスフォリラーゼb(M.W. 97,400)、牛血清アルブミン(M.W. 66,267)、アルドラーゼ(M.W. 42,400)、カルボニックアンヒドラーゼ(M.W. 30,000)、トリプシンインヒビター(M.W. 20,100)、リゾチーム(M.W. 14,400)のバンドである。

【0044】

得られた精製酵素について、反応温度と活性の関係を調べた。測定結果を図7(a)に示す。尚、図7(a)のグラフでは、65℃で反応させたときの活性値を100%とした場合の相対活性(%)を表した。図7(a)のグラフから明らかなように、40℃~70℃の広い範囲で高い活性が認められる。また、反応温度を75℃にした場合であっても約50%の活性が認められる。このように、当該酵素は広範囲の温度条件下で良好に作用することがわかった。

続いて、当該酵素の熱安定性を次の手順で調べた。2.8 µg (総タンパク質量) の酵素溶液 (0.15ml) を、pH5.0の酢酸バッファーを用いてpH 5.6に調整した後、各温度 (40℃、50℃、60℃、65℃、70℃、75℃) で30分間処理し、残存活性 (未処理の場合の酵素活性に対する%) を測定した。測定結果を図7(b)に示す。65℃以下の処理条件では約90%以上の活性を維持している。また、70℃で処理した場合でも約55%の活性を維持している。この

ように、当該酵素は極めて熱安定性に優れることが判明した。

次に、当該酵素について、pHと活性の関係を調べた。測定結果を図8(a)に示す。尚、図8(a)のグラフでは、pH5.6で反応させたときの活性値を100%とした場合の相対活性を表した。pHが約4.5～約8.5の範囲で比較的高い反応性が認められ、約5.0～約8.0の範囲では約70%以上の反応性が認められる。また、pH9.0の条件であっても約40%の反応性が得られることがわかる。

次に、当該酵素のpH安定性を次の手順で調べた。2.8 μ g (総タンパク質量) の酵素溶液 (0.15ml) を、pH3～8は、マッキュルバイン (McIlvaine) 緩衝液、pH8～10は、アトキンスーパンチン (Atkins-pantin) 緩衝液で各条件のpHに調整し、30℃で30分間放置した後、残存活性 (pH7.0処理の場合の酵素活性に対する%) を測定した。測定結果を図8(b)に示す。pHが約6.0～約8.5の範囲で比較的高い活性を維持し、約6.5～約8.0の範囲では約80%以上の活性を維持していることがわかる。

【0045】

(6) ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの基質特異性

ストレプトマイセス・オレオファシエンス (*Streptomyces aureofaciens*) 由来のアデノシンデアミナーゼは、AMPの触媒能を有するなど幅広い基質特性を有していると報告されている (非特許文献2)。このことを考慮し、上記の方法で得られたストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来デアミナーゼがAMPデアミナーゼ (AMP-deaminase) 及びアデノシンデアミナーゼ (Adenosine-deaminase) のいずれであるのかを確認するため、その基質特異性を検討した。結果を図9の表に示す。尚、5' AMPに対する酵素活性を100%とした場合の相対活性を表している。当該酵素は5' AMPに対して最もよく作用した。また、3' AMP、5' dAMP、ADP、ATP、アデノシン (Adenosine) 及び3'5'-cyclic AMPに対しても作用したが、2' AMP、アデニン (adenine) に対しては全く作用しなかった。特に、5' dAMP、ADP及びATPに対して良好に作用した。以上の結果から、上記の方法で得られたストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来デアミナーゼがAMPデアミナーゼであることが確認された。また、5' dAMP、ADP及びATPを基質とする反応についても当該酵素を好適に利用できることが判明した。

【0046】

(7) ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの酵素化学的諸性質

上記の方法で得られたストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの等電点を求めるためにクロマトフォーカシングを行った。MonoPカラム (ファルマシア製) を使用し、開始バッファー (Start Buffer) を0.075M トリス酢酸バッファー (pH9.3)、溶出バッファー (Poly buffer 96) を塩酸でpH4.0に調製し、最終量を100mlとした。また、プレグラジェント (Pre-gradient) を3ml、グラジェント溶出 (gradient eluent) を30ml、溶出 (eluent) を30mlで行った。クロマトフォーカシングの結果を図10のグラフに示す。この結果から、アイソザイムが少なくとも2つ (pI 8.12、7.02) あるように思われたが、メイン画分の等電点は、8.12であった。尚、以上の結果得られた等電点を含め、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼの諸性質を図11の表にまとめた。この表に示されるように、ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) 由来AMPデアミナーゼは、ゲル濾過による分子量が約48,000 $\pm$ 2,000 (SDS-PAGEによる分子量は60,000 $\pm$ 3,000)、至適pHが約5.6、至適温度が約65℃、等電点が8.12、Km値が0.95mM、Vmaxが 3.5×10^7 μ mol/min/mgであった。

【0047】

(8) ストレプトマイセス属からのAMPデアミナーゼ生産菌の探索

以上の検討から、ストレプトマイセス属に属する放線菌の一つであるストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) が耐熱性AMPデアミナーゼを生産することが示されたので、ストレプトマイセス属の他の株からも耐熱性AMPデアミナーゼが得られる可

能性があると予想された。そこで、天野エンザイム保存菌株中のストレプトマイセス属においてAMPデアミナーゼ生産菌のスクリーニングを行った。その結果、AMPデアミナーゼを生産するものは、ストレプトマイセス・グリセウス サブエスパー グリセウス (*Streptomyces griseus* subsp. *griseus*)、ストレプトマイセス・グリセウス (*Streptomyces griseus*)、及びストレプトマイセス・セルロフラバス (*Streptomyces celluloflavus*) の3株から見出された。これら3株の生産するAMPデアミナーゼについて熱安定性及び基質特異性を検討した。その結果を図12に示す。尚、熱安定性試験では、培養によって得られた粗酵素溶液を使用し、処理条件を65℃、30分間とした。また、無処理の場合を100%とした残存活性を求めた。基質特異性（アデノシンに対する特異性）に関しては、AMPを基質として用いた場合の活性値を100%とした場合の相対活性とした。

10

図12から明らかなように、上記3株全てにおいて、アスペルギルス・メレウス (*Aspergillus melleus*)由来デアミナーゼよりも熱安定性が優れていた。このことからストレプトマイセス属の放線菌が生産するデアミナーゼは一般に熱安定性が高い傾向にあることが示唆された。尚、以上3株が生産するデアミナーゼはアデノシンよりもAMPに対して良好に作用し、AMPデアミナーゼであることが確認された。

【実施例2】

【0048】

ストレプトマイセス・ミュリナス由来AMPデアミナーゼの同定

1. アミノ酸配列解析

上記実施例の手順に従いストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802を培養し、精製酵素を得た。但し、精製はHiPrep™16/10 ButylFF（ファルマシア）を用いたButyl Sepharoseカラムによる精製までとした。分画サンプルをゲルPAG Mini “DAIICHI” 10/20（第一化学薬品）を用いてSDS-PAGEを行った。泳動後のゲルを、0.01% SDSを加えたTowbin 緩衝液（Tris 25mM、glycine 192mM、メタノール5%）を転写緩衝液として用いPVDF膜に転写した。転写操作はバッファータンク型転写装置を用いて定電圧20V、4℃、18時間の条件下で行った。転写後CBB（クマシーブリリアントブルーR 250）（フルカ）染色を行い当該酵素にあたるバンドを切り出しN末端アミノ酸配列解析用サンプルとした。同様に泳動後のゲルをCBB染色し当該酵素にあたるバンドを切り出し、そのまま内部アミノ酸配列解析用サンプルとした。これらのサンプルのアミノ酸配列を解析した結果を図13に示す。

20

30

【0049】

2. ストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802からのゲノムDNAの抽出

上記実施例の手順に従いストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802を培養し、プフナーろうと及びヌッチェ吸引瓶を用いて培養液をろ過して菌体を得た。菌体1gを4mg/ml リゾチーム（ロッシュ・ダイアグノスティックス）、2mg/ml アクロモペプチダーゼ（和光純薬）を含むTE（10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA）溶液10mlに懸濁して30℃、1時間溶菌した。0.5mM EDTA溶液 2.4mlを加え10mg/ml プロナーゼE（科研化学）260μlを加えて更に30℃、5分間溶菌した。次に10% SDS溶液1.4mlを加え上下に混合して37℃、2時間インキュベートした。0.1M NaClを含むTE溶液で平衡化した12mlのフェノールを加えて5分間攪拌後、12mlのクロロホルムを加えて更に5分間攪拌した。その後遠心分離（1,500g、室温、5分間）を行い上清を得た。この操作を2回繰り返して得られた上清に10mg/ml RNase A（シグマアルドリッチジャパン）72μlを加えて37℃、1時間インキュベートした。5M NaClを4.5ml加えて混合後、30% ポリエチレングリコール6000（和光純薬）溶液を11.25ml加えて混合し4℃で一晩放置した。析出したゲノムDNAをパスツールピペットを用いて巻き取り、70% エタノールで洗浄して風乾した後TE溶液1mlに溶解し約1mg/mlのゲノムDNA溶液を得た。

40

【0050】

3. 合成プライマーの設計

上記の内部アミノ酸配列解析の結果を考慮し、下記の合成プライマー（インビトロジェ

50

ン)を設計した。

プライマーIS-F 5' - TTC GGI GAG GTI ACI GCI CGI CAY MG -3' (配列番号: 6)

アミノ酸配列 N末端 - F G E V T A R H R G -C末端

プライマーIS-R 3' - CTY CGI CTR CTG CCI CTG CGI CTC AA -5' (配列番号: 7)

アミノ酸配列 N末端 - E A D D G D A E F R -C末端

【0051】

4. サザンハイブリダイゼーション、コロニーハイブリダイゼーション用プローブの作製

上記で得られたストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802由来のゲノムDNAを鋳型としたPCR反応を行った。TaKaRa LA TaqTM with GC buffer (宝酒造)を用いて上記の合成プライマーIS-F、IS-Rを2 μ M、鋳型としたゲノムDNA 50ngを反応系に加えた。反応は96 $^{\circ}$ C・3分間インキュベート後96 $^{\circ}$ C・45秒間、66 $^{\circ}$ C・1分間、72 $^{\circ}$ C・3分間のサイクルを35回繰り返し、最後に72 $^{\circ}$ C・10分間インキュベートした。アガロース電気泳動後、GENECLEANTMIII (BIO101)を用いて、特異的に増幅した約240bpのDNA断片を抽出した。抽出したDNA断片をpGEMTM-T Easy (プロメガ)にサブクローンした後、挿入DNA断片を再び抽出し、そしてDIG High Prime (ロッシュ・ダイアグノスティックス)を用いてDIG標識し、AMPデアミナーゼ遺伝子のプローブとした。

【0052】

5. サザンハイブリダイゼーション

任意の制限酵素で完全消化したゲノムDNAを1レーンあたり6 μ gずつアプライしたアガロース電気泳動を行った。泳動終了後0.25N HCl溶液で30分間処理し、電気泳動に用いたバッファーで中和後0.4N NaOH溶液を用いたアルカリブロットティングによりZeta-ProbeTMメンブレン (バイオラッド)にブロットティングした。転写は2016 VacuGene (ファルマシアLKBバイオテクノロジー)を用いて真空度50cm $\cdot$ H₂Oで90分間行った。ブロットティング後2 x SSC (NaCl 0.3M、クエン酸ナトリウム 33.3mM)溶液でメンブレンを洗浄し、風乾後80 $^{\circ}$ C 30分間インキュベートしDNAをメンブレンに固定化した。固定化したメンブレンに対して上記のプローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行いDIG Nucleic Acid Detection Kit (ロッシュ・ダイアグノスティックス)を用いて検出を行った。このようにして当該酵素遺伝子の制限酵素地図を作製した (図14)。

【0053】

6. コロニーハイブリダイゼーション

ゲノムDNA 12 μ gを制限酵素Not I (宝酒造)を用いて完全消化した後、アガロース電気泳動によりDNA鎖長3.8kbpのDNA断片を切り出し、続いてGENECLEANTMIII (BIO 101)を用いて抽出してライブラリー作製の為のインサートとした。同時にpBluescriptII KS(+) (ストラタジーン)をNot I (宝酒造)を用いて完全消化した後Alkaline Phosphatase (宝酒造)を用いて脱リン酸化したものをライブラリー作製の為のベクターとした。インサートとベクターをLigation Kit ver.2 (宝酒造)を用いてライゲーションし大腸菌DH5株コンピテントセル (東洋紡績)にHanahanの方法 (J Mol Biol. 1983 Jun 5;166(4):557-80, Hanahan D., Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids)を用いて形質転換を行った。得られたクローンをLAプレート (アンピシリン(シグマアルドリッチジャパン)100 μ g/ml)一枚あたり約500のコロニーを形成するように撒き、37 $^{\circ}$ C一晩インキュベートしてコロニーを生育させた。生育した総計約9,500のコロニーをNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロッシュ・ダイアグノスティックス)にリフトし、メンブレン上にDNAを固定化した。先に示したプローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行いDIG Nucleic Acid Detection Kit (ロッシュ・ダイアグノスティックス)を用いて強いシグナルを示すコロニーを検出した。以上の操作方法は全て使用した試薬に添付されたプロトコールに従った。こうして得られたクローンをpSADと名づけストレプトマイセス・ミュリナス (*Streptomyces murinus*) IF014802由来AMPデアミナーゼ遺伝子を含むクローンとした。

【0054】

7. AMPデアミナーゼ遺伝子の塩基配列解析

まず始めにM13 Primer M4、M13 Primer RV（宝酒造）を用いてインサートの外側から塩基配列解析を実施した。単離したクローン、及びプローブに用いたDNA断片を塩基配列解析した結果明らかとなった当該酵素遺伝子の配列をもとに再度合成プライマー（シグマジェノシス）を設計し塩基配列解析を行った。これらの操作を繰り返し行うプライマーウォーキングにより全長DNA配列を解析した。塩基配列解析はBigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit及びdGTP BigDye™ Terminator v3.0 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit（アプライドバイオシステムズジャパン）を用い、解析はABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer（アプライドバイオシステムズジャパン）を使用した。以下に塩基配列解析に用いた合成プライマーを示す。

MAD-F1: 5' -AAGCAACTCGCCGACCAG-3'（配列番号：8）

10

MAD-F2: 5' -TGGTCCATGCAGGACTTC-3'（配列番号：9）

MAD-F3: 5' -CTGGAGAACTACAGCCTC-3'（配列番号：10）

MAD-F4: 5' -CAGATCCTCGGCGTCAAG-3'（配列番号：11）

MAD-F5: 5' -CTCCAGTACGCCTTCCTG-3'（配列番号：12）

MAD-F6: 5' -GTCGGGTCTGGACACCG-3'（配列番号：13）

MAD-F7: 5' -TATACCGTCCGGTAGGTC-3'（配列番号：14）

MAD-F8: 5' -GGACAGGAAGACGGACAC-3'（配列番号：15）

MAD-F9: 5' -GATTGGCCGAGAAGTACG-3'（配列番号：16）

MAD-R1: 5' -TGGTCTGGCGAGTTGCTTG-3'（配列番号：17）

MAD-R2: 5' -CAGGGACAGGACACTGAG-3'（配列番号：18）

20

MAD-R3: 5' -GATGTCGACATGGCCCTG-3'（配列番号：19）

MAD-R4: 5' -CCCAGTCGATCGCGTGAG-3'（配列番号：20）

MAD-R5: 5' -TGGTCTGTTCCGTGAAGGC-3'（配列番号：21）

MAD-R6: 5' -CTCGAACGCCCGCAACGC-3'（配列番号：22）

MAD-R7: 5' -CTGGGTGTGCGCGATGTC-3'（配列番号：23）

MAD-R8: 5' -CACCATCATCGCCACCTG-3'（配列番号：24）

【0055】

解析の結果同定された全塩基配列（配列番号：3）を図21～22、及び図25～26に示す。また、相同性検索及びモチーフ検索を用いたアノテーションによってプロモーター領域、コード領域（配列番号：4）、及びターミネーター領域を明かにした（図21～22）。プロモーター領域の配列を図27に、コード領域の配列を図28に、ターミネーター領域の配列を図29にそれぞれ示す。また、塩基配列から推定されたアミノ酸配列を図23（シグナルペプチドを含まない、配列番号：1）及び図24（シグナルペプチドを含む、配列番号：2）に示す。

30

【0056】

8. 放線菌用ベクターpIJ702の取得

プラスミドpIJ702を保有するストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）3131(ATCC 35287)を以下の培地条件で30℃、2日間培養した。

YEME培地 + 0.5%グリシン + 50 µg/mlチオストレプトン（和光純薬）

イースト・エキス	3g
ペプトン	5g
マルト・エキス	3g
塩化マグネシウム	1g
グルコース	10g
サッカロース	340g
グリシン	5g

40

50mg/ml チオストレプトン溶液（ジメチルスルホキシド溶液）1ml／L（pH7.0）

【0057】

培養後の培地200mlを遠心分離（12,000g、4℃、10分間）し、得られた菌体をTE-Sucrose（50mM Tris-HCl(pH8.0)、10mM EDTA、25% Sucrose）10mlに懸濁した。次に30mg/mlの

50

リゾチーム（シグマアルドリッチジャパン）を含むTE-Sucrose 2ml及び0.25mM EDTA溶液 4mlを加え、これを37℃で30分間インキュベートした。インキュベート後20% SDS溶液 2mlを加え、さらに5M NaCl溶液 5mlを加えて穏やかに攪拌した後、0℃で1晩インキュベートした。次に遠心分離（100,000g、4℃、40分間）により得られた上清に30% ポリエチレングリコール6000（和光純薬）溶液を終濃度10%になるように加え、0℃で4.5時間インキュベートした。その後、遠心分離（900g、4℃、5分間）し、沈殿を50mM NaClを含むTE溶液に溶解した。そして塩化セシウム16.8g及び10mg/mlの濃度にエチジウムブロマイドをTE溶液に溶かして調整した溶液1.2mlを加え、遠心分離（1,300g、室温、15分間）により残さを取り除いた後、再び遠心分離（230,000g、20℃、12時間）を行った。遠心後、紫外線照射下でプラスミドDNA層を得た。次にTE溶液で飽和したブタノールによる抽出を行ってエチジウムブロマイドを除いた。この抽出を3回繰り返して行った。得られたプラスミドDNA溶液はTEを透析外液として4℃で1晩の透析に供した。その後、TE溶液飽和フェノールで1回、クロロホルム・イソアミルアルコールで2回抽出処理を行った。次に、1/10容量の3M酢酸ナトリウム(pH5.2)溶液と2倍容量のエタノールを加え、-80℃に30分間静置した。その後、遠心分離（12,000g、4℃、15分間）により沈殿を回収し、沈殿を70% エタノールで洗浄し、乾燥させた。これをTE溶液 200 µlに溶かした。以上の操作によって最終的に得られたDNA量は約10 µgであった。

【0058】

9. シャトルベクターpSV1の構築

まず、大腸菌用ベクターpUC19（宝酒造）を制限酵素Bam HIで消化したDNA断片と、放線菌用ベクターpIJ702をBcl I（宝酒造）で消化して得られるチオストレプトン耐性遺伝子（tsr）を含むDNA断片を用意し、これらをDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造）を用いて連結することによりpUCTSRを作製した。次にpUCTSRをKpn I、Cla I（宝酒造）で消化して得られるDNA断片（長断片）と、pIJ702をKpn I、Cla I（宝酒造）で消化して得られるDNA断片（短断片）を用意し、これらをDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造）を用いて連結した後、大腸菌DH5株（東洋紡）に形質転換した。こうして得られた形質転換体を持つpUC19断片とpIJ702断片が連結したプラスミドをシャトルベクターpSV1とし、後の操作に用いた（図15）。

【0059】

10. 発現ベクターpSVSADの構築

AMPデアミナーゼ遺伝子を保持するpSADを制限酵素Not I（宝酒造）で消化し当該遺伝子断片を用意した。またシャトルベクターpSV1を制限酵素Xba Iで消化しベクター断片を用意した。両者をDNA Blunting Kit（宝酒造）を用いて末端を平滑化しそれぞれをインサート断片、ベクター断片とした。pSV1由来ベクター断片は更にAlkaline Phosphatase（宝酒造）を用いて脱リン酸化処理を行った。インサートとベクターをDNA Ligation Kit Ver.2（宝酒造）を用いて連結した後、大腸菌DH5株（東洋紡）に形質転換した。こうして得られたプラスミドを発現ベクターpSVSADとし、形質転換に用いた（図16）。

【0060】

11. ストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）TK24 プロトプラストの調製

ストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）TK24はストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）66由来のストレプトマイシン耐性を持つ株であり、D. A. Hopwood (John Innes Institute, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, U. K.) から提供されたものである。ストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）TK24をYEME培地（0.5%グリシン）で30℃、2日間培養した。培養後の培地200mlを遠心分離（1,300g、室温、10分間）し、得られた菌体を0.35Mサッカロース溶液72mlに懸濁した。次に、この懸濁液を遠心分離（1,300g、室温、10分間）し、菌体を1mg/mlのリゾチーム（シグマアルドリッチジャパン）を含むP緩衝液60mlに再懸濁し、これを30℃、2.5時間インキュベートした。インキュベート後の懸濁液を脱脂綿でろ過して残さを取り除いた。次に得られたろ液を遠心分離（1,300g、室温、10分間）し、沈渣をP緩衝液25mlで洗浄し

10

20

30

40

50

た。この洗浄を2回繰り返した後、沈殿をP緩衝液1mlに懸濁し、これをプロトプラスト懸濁液とした。

P緩衝液

TES[N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethane sulphonic acid] 5.73g

サッカロース 103g

塩化マグネシウム 2.03g

硫酸カリウム 0.5g

塩化カルシウム 3.68g

Trace element solution 2ml/L (pH7.4)

尚、1%リン酸一カリウム溶液を別に調製し、これを使用直前に100mlP緩衝液当たり1ml 10
加えた。

Trace element solution

塩化亜鉛 40mg

塩化第二鉄 200mg

塩化第二銅 10mg

塩化マンガン 10mg

四硼酸ナトリウム 10mg

モリブデン酸アンモニウム 10mg/L

【0061】

12. ストレプトマイセス・リビダンス (*Streptomyces lividans*) TK24 の形質転換 20
以下の各溶液を混合し、全量121μlとした。

AMPデアミナーゼ発現プラスミドpSVSAD(4μg)を含むTE溶液 1μl

ストレプトマイセス・リビダンス TK24 プロトプラスト 100μl

0.35M サッカロース溶液 20μl

次に、20%ポリエチレングリコール1000を含むP緩衝液を1.5ml加えピペッティングにより穏やかに混合し室温で2分間静置した。この混合液を遠心分離（1,700g、室温、10分間）し、沈殿を集めた。沈殿として得られたプロトプラストをP緩衝液で2回繰り返して洗浄した。ペレットを0.3mlのP緩衝液に再懸濁した後に、100μlずつR-2培地に滴下した。次いで55℃に保温したR-2トップアガロース培地をプレートあたり3ml流し込みプロトプラストをプレート全体に散布させた。プレートはトップアガロースが固化するまで2時間クリーンベンチ内で乾燥させた。乾燥後30℃で16時間培養した後、200μg/mlチオストレプトンを含むR-2トップアガロース培地3mlを加え、プレートの表面を覆い2時間乾燥させた。更に4日間プレートを30℃で培養しチオストレプトン耐性を獲得した形質転換体（SAD-1）を得た。

【0062】

R-2培地は以下に示したR-2/A及びR-2/Bを別々に調製した後、組み合わせて作製した。寒天を含む培地をR-2プレート、アガロースを含む培地をR-2トップアガロース培地とした。プレート培地作製時にR-2/A、R-2/Bを混合し、更に1% KH_2PO_4 を最終容量200mlあたり1mlの割合で混合した。

R-2/A

硫酸カリウム 0.5g

塩化マグネシウム 20.2g

塩化カルシウム 5.9g

グルコース 20.0g

プロリン 6.0g

カザミノ酸 0.2g

Trace element solution 4.0ml

寒天 44.0g/L またはアガロース5.0g/L

R-2/B

TES 11.5g

40

50

イースト・エキス 10.0g
サッカロース 203g/L(pH7.4)

【0063】

13. 形質転換体の培養

上記実施例の手順（＜酵素液の調製方法＞の欄）に準じてソルビーNY 2%、ミーストP1G 0.5%、KH₂PO₄ 0.1%、MgSO₄ 0.05%、可溶性デンプン 3%を加えてpH5.7に調整し、121℃で30分間殺菌を行った。形質転換体SAD-1と形質転換の宿主株ストレプトマイセス・リビダンス（*Streptomyces lividans*）TK24を植菌し、30℃で前培養を2日間、本培養を5日間行った。培養上清の一部を採取し、これを以下のAMPデアミナーゼ活性測定用の試料とした。

10

【0064】

14. AMPデアミナーゼ活性測定

上記で得た試料の酵素活性を、実施例に示した方法（＜酵素活性測定方法＞の欄）に従い測定した。0.017Mの5' AMP-2Naと1/15Mリン酸塩緩衝液（pH5.6）を1:2の割合で混合した溶液1.5mlに試料溶液0.5mlを添加して反応液とし、37℃で15分間反応させた。15分後に2%過塩素酸溶液を添加して反応を停止させた後、100 μlを量りとした。水を加えて5mlとしてOD₂₆₅を測定した。反応時間を0分として同様に測定したものをブランクとした。以下の条件下、60分間に吸光度差が0.001減少するときを1単位とした。測定結果を図17に示す。尚、ストレプトマイセス・リビダンスTK24を同様の条件で培養した後の培養上清を対照（コントロール）の試料とした。

20

図17に示されるように、形質転換体SAD-1の培養上清には高いAMPデアミナーゼ活性が認められた。この結果から、AMPデアミナーゼ遺伝子の取得に成功したことが確認された。併せて、当該遺伝子を用いてAMPデアミナーゼ生産系を実際に構築できることが示された。

【0065】

15. 形質転換体（SAD-1）由来AMPデアミナーゼの熱安定性

形質転換体（SAD-1）が生産するAMPデアミナーゼの熱安定性を測定した。上記の方法で調製したSAD-1の培養上清を所定の温度で処理した後、残存AMPデアミナーゼ活性を測定した（pH 5.6）。尚、処理温度は、30℃、40℃、50℃、60℃、65℃、70℃、及び75℃とした。また、処理時間は30分間とした。

30

測定結果を図18のグラフに示す。図1に示したストレプトマイセス・ミュリナス（*Streptomyces murinus*）由来のAMPデアミナーゼと同様な熱安定性を示していることが分かる。

【0066】

16. 形質転換体（SAD-1）由来AMPデアミナーゼの基質特異性

上記の方法で得られた形質転換体（SAD-1）由来デアミナーゼがAMPデアミナーゼ（AMP-deaminase）及びアデノシンデアミナーゼ（Adenosine-deaminase）のいずれであるのかを確認するため、その基質特異性を検討した。結果を図19の表に示す。尚、5' AMPに対する酵素活性を100%とした場合の相対活性を表している。当該酵素は5' AMPに対して最もよく作用した。また、3' AMP、5' dAMP、ADP、ATP、アデノシン（Adenosine）及び3' 5' -cyclic AMPに対しても作用したが、2' AMP、アデニン（adenine）に対しては全く作用しなかった。特に、5' dAMP、ADP及びATPに対して良好に作用した。以上の結果から、形質転換体（SAD-1）由来デアミナーゼがストレプトマイセス・ミュリナス（*Streptomyces murinus*）由来AMPデアミナーゼと類似しており、AMPデアミナーゼであることが確認された。また、5' dAMP、ADP及びATPを基質とする反応についても当該酵素を好適に利用できることが判明した。

40

【0067】

17. 形質転換体（SAD-1）由来AMPデアミナーゼの生産確認

SAD-1の培養上清をSDS-PAGE（CBB染色）に供し、当該酵素の形質転換体による生産を確認した。SDS-PAGEの結果を図20に示す。レーンIIがコントロール（宿主菌培養上清）で

50

ある。レーンIIIが形質転換体（SAD-1）培養上清である。レーンIIIではレーンIIにないバンドが存在し、形質転換によって新規な酵素タンパクが生産されるようになったことがわかる。レーンIにはタンパク質分子量マーカーのバンドが示される。高分子量側から順にフォスホリラーゼb(M.W. 97,000)、牛血清アルブミン(M.W. 66,000)、オボアルブミン(M.W. 45,000)、カルボニックアンヒドラーゼ(M.W. 30,000)、トリプシンインヒビター(M.W. 20,100)のバンドである。

【0068】

以上のように本発明者らはストレプトマイセス・ミュリナス由来のAMPデアミナーゼをコードする遺伝子のクローニングに成功した。また、放線菌の形質転換系を用いて、当該遺伝子が導入された形質転換体を取得することに成功し、当該遺伝子の発現を確認した。これらの成果によって当該酵素を組換え体として生産することが可能となった。従って、安定供給が可能になることはもとより、遺伝子組換えによる当該酵素の生産性の向上や酵素本体の改良等を行うことも可能となる。例えば、(1)高生産を示すプロモーターの利用による生産性の向上、(2)生産性の高い菌株を宿主として利用することによる高生産性形質転換体の作製及びそれを利用した高生産系の構築、(3)塩基配列・アミノ酸配列を改変することによる、生産性の向上、安定性の向上、及び/又は基質特異性の改良等を行うことができる。

【産業上の利用可能性】

【0069】

本発明のAMPデアミナーゼは熱安定性に優れる。従って、高温下での反応が望まれる用途において好適に利用される。例えば、酵母エキスの製造における旨味増強用の酵素として、或いは調味料の5'-イノシン酸製造用の酵素として本発明のAMPデアミナーゼを利用することができる。

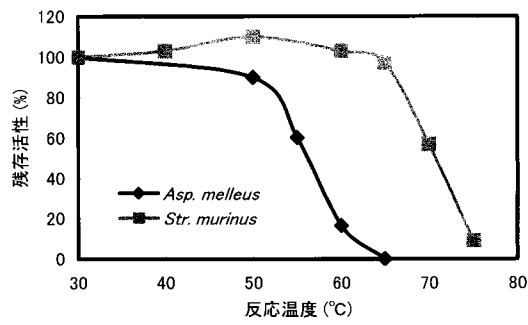
一方、AMP以外の基質にも作用するという特性を活かして、これらADP、ATP、5'-dAMP等の基質を出発材料とする各種の反応において、本発明のAMPデアミナーゼを利用することも可能である。

【0070】

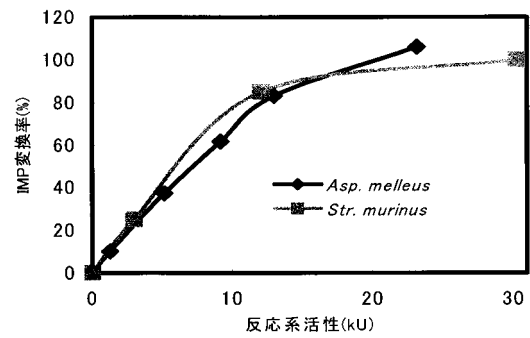
この発明は、上記発明の実施の形態及び実施例の説明に何ら限定されるものではない。特許請求の範囲の記載を逸脱せず、当業者が容易に想到できる範囲で種々の変形態様もこの発明に含まれる。

本明細書の中で明示した論文、公開特許公報、及び特許公報などの内容は、その全ての内容を援用によって引用することとする。

【図 1】



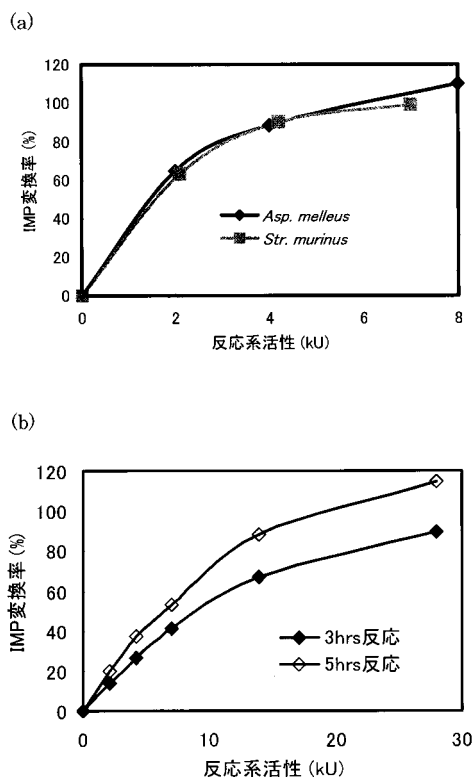
【図 3】



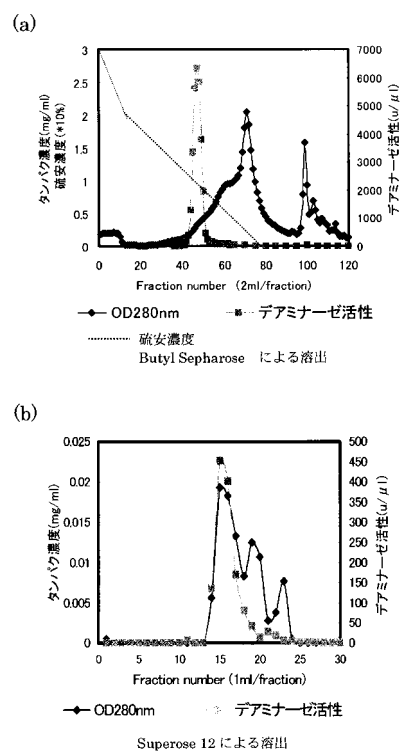
【図 2】

	ホスファターゼ/デアミナーゼ(mU)
<i>Asp. melleus</i>	0.97
<i>Str. murinus</i>	ホスファターゼ検出限界以下

【図 4】

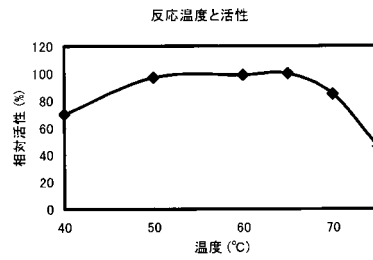


【図 5】

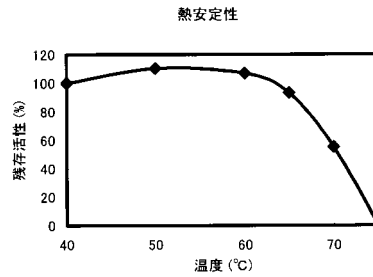


【図 7】

(a)

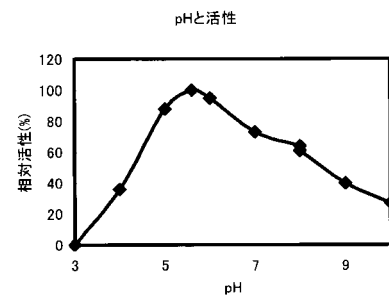


(b)

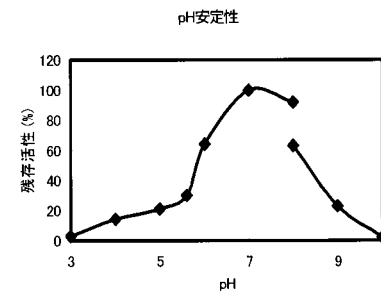


【図 8】

(a)



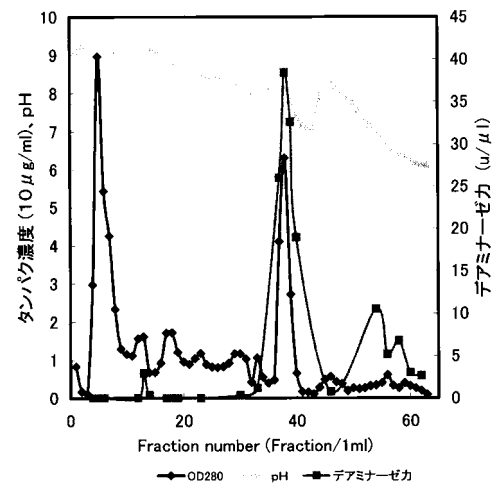
(b)



【図 9】

基質	相対活性 (%)
5'AMP	100
3'AMP	18
2'AMP	0
5'dAMP	42
ADP	84
ATP	74
Adenosine	9
Adenine	0
3'5'cyclic AMP	12
5'GMP	0
5'UMP	0
5'CMP	0

【図 10】



【図 11】

分子重 SDS-PAGE	ヌクレオチドリンターゼ G		
	<i>Penicillium citrinum</i>	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Streptomyces murinus</i>
分子量	275,000	48,000	60,000
最適 pH	5.0	5.6	5.6
最適温度	70°C	50°C	65°C
等電点			8.12
<i>K_m</i> 値		1.0mM	0.95mM
<i>V_{max}</i>		2.5×10^{-6} mol/min/mg	3.5×10^{-7} mol/min/mg

【図 1 2】

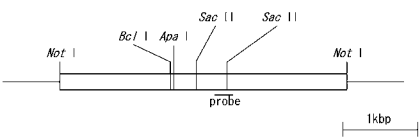
菌株名	65℃処理	Adenosine に対する特性
	残存活性(%)	相対活性(%) ²
<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>	11	13
<i>Streptomyces griseus</i>	6	24
<i>Streptomyces cellulosus</i>	32	12
<i>Streptomyces murinus</i>	94	9
<i>Aspergillus melleus</i>	0	63

【図 1 3】

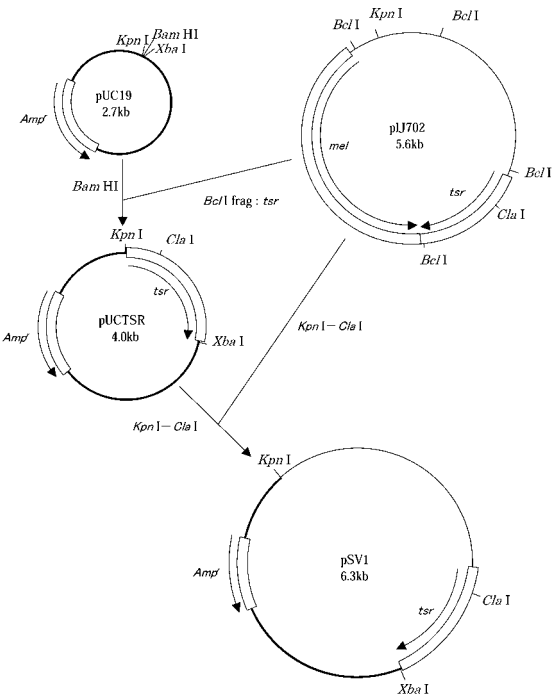
N 末端アミノ酸配列 2nd candidate N 末端 - A P P E H Q A T D A E F R T D - C 末端
T D D A G V L

内部アミノ酸配列 frc. 14 N 末端 - E A D D G D A E F R - C 末端
frc. 18 N 末端 - F G E V T A R H R G - C 末端

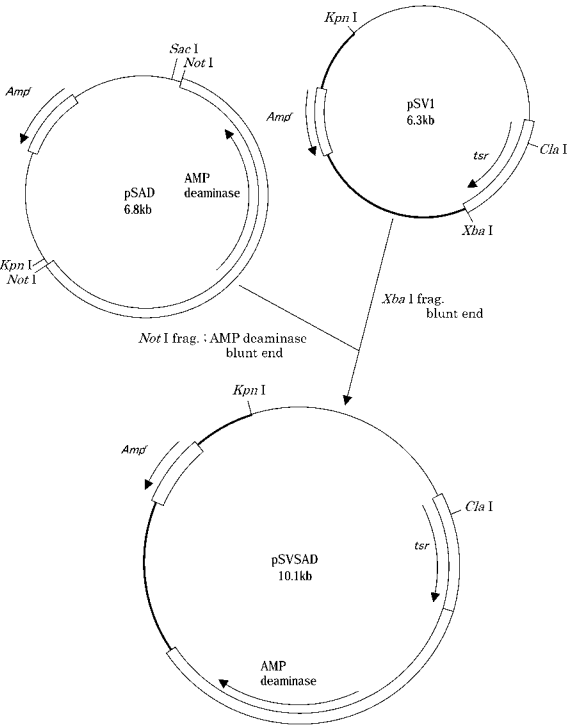
【図 1 4】



【図 1 5】



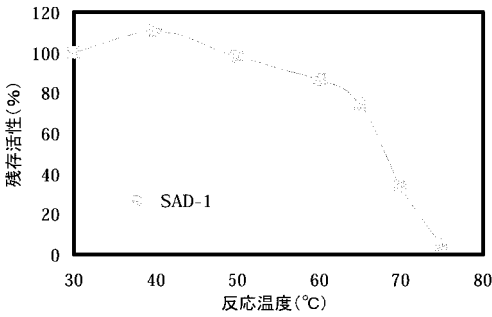
【図 1 6】



【図 1 7】

	培養上清 (5 日培養) の酵素活性
<i>S. lividans</i> TK24	ND
pSVSAD / <i>S. lividans</i> TK24 (SAD-1)	2912 U / μ l

【図 1 8】



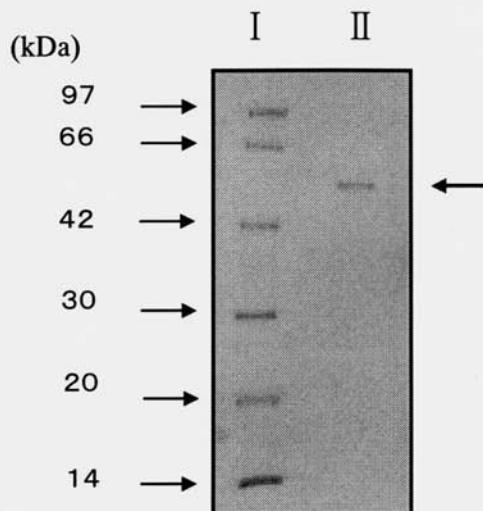
CCCTGGTCTCCGGCTCCGGGGCTGGTGGACGGCGCGCGCCGGATATGATATGATATGGCTGAGAGATACGAGGTTATATACACCGG
 ATGACCCCGAATTCCTGTCGGGAGAGCGGCTCGGGCTTCCTGCGCATATACCGGGGTTTCGGACGACGATGTTCCGGTAATCCCAAC
 GACACCGCCCTGCTGACGGCCGCTGACGAGGAGATGCTCTCCCTTAAATGATATGACATGCTGATACATAGCTTCC
 CCGAGCCCGATTTTCGGGCGCTGCTGGGGTCTGGTGAAGTGGAGGATGACGCGCGCGCGGCGATGGCTTCC
 GGACCATGCGATCAACTCTGTGTGAGAGCCTCGGGTCTACACGCGGCTCTGCGCGTGTCTCTGCGGCTCTTGAGTCTCAGC
 ACCATCGCAGACGATCCAGACCGACCGCGCGGCTCACTTCAGACGACGACGACGACACCAACCCCGGGTCTTGCTGTGAT
 CMACTGTGATGAGCTACCGACACGACGACGCTACGACGCTCTGTTCTGCTGTTACCGACGATGATGACGACCTTGACGTA
 CCGACGACGCTCCGAGCTGAGATACAGCTTCAGCGGCTGACACCTGCGCGGCTCGC

【図 6】

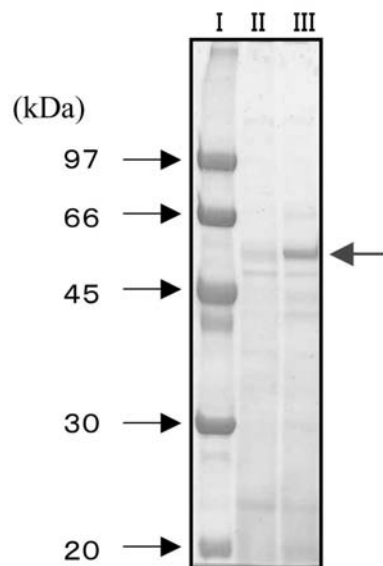
(a)

Step	全活性(10 ⁶ u)	全タンパク(mg)	比活性(10 ⁶ u/mg)	収率(%)
粗酵素	105	592	0.177	100
硫酸分画	89.9	150	0.598	85.9
Butyl Sepharose (Frc.45-48)	11.1	2.13	5.22	10.6
Superose12 (Frc.15-16)	1.91	0.112	17.0	1.82

(b)



【図 20】



【配列表】

0004663631000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I		
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
<i>C 1 2 N</i>	<i>5/10</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>
<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>
<i>C 1 2 R</i>	<i>1/465</i>	<i>(2006.01)</i>	<i>C 1 2 N</i>	<i>9/78</i>	
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 N</i>	<i>1/15</i>	
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 N</i>	<i>1/19</i>	
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 N</i>	<i>1/21</i>	
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 N</i>	<i>5/00</i>	<i>1 0 1</i>
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 N</i>	<i>15/00</i>	<i>Z N A A</i>
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 P</i>	<i>19/30</i>	
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	
			<i>C 1 2 P</i>	<i>21/02</i>	<i>C</i>
			<i>C 1 2 R</i>	<i>1:465</i>	

- (72)発明者 安藤 啓一
愛知県名古屋市中区錦一丁目2番7号 天野エンザイム株式会社
- (72)発明者 結城 健介
岐阜県各務原市須衛町四丁目179番35 天野エンザイム株式会社 岐阜研究所内

審査官 神谷 昌男

- (56)参考文献 Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1978年, 43(9), 2324-9
J. Org. Chem., 1994年, 59(24), 7214-8
Biotechnol. Bioeng., 2002年, 80(2), 185-94
J. Gen. Appl. Microbiol., 1968年, 14, 111-9
J. Ferment. Bioeng., 1991年, 71(1), 6-11
日本農芸化学会誌, 1964年, 38(3), 144-8,
Collection Czechoslov. Chem. Commun., 1978年, 43(9), 2330-40

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N15/00-15/90
C12N 9/00-9/99
C12N 1/00-7/08
C12P 1/00-41/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
REGISTRY/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
PubMed