

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580012493.X

[51] Int. Cl.

C12N 15/52 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月11日

[11] 公开号 CN 1946847A

[22] 申请日 2005.4.21

[21] 申请号 200580012493.X

[30] 优先权

[32] 2004.4.21 [33] JP [31] 125486/2004

[86] 国际申请 PCT/JP2005/007626 2005.4.21

[87] 国际公布 WO2005/103260 日 2005.11.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.20

[71] 申请人 协和发酵工业株式会社

地址 日本东京

[72] 发明人 桥本信一 田畑和彦 野口文子

足立雄悟

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 4 页 说明书 35 页 序列表 7 页
附图 1 页

[54] 发明名称

二肽的制备方法

[57] 摘要

按照本发明，可以提供具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质；编码具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的 DNA；含该 DNA 的重组体 DNA、带有该重组体 DNA 的转化体；具有二肽合成活性的蛋白质的制备方法；使用具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的二肽的酶合成法；将具有产生二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的能力微生物或转化体的培养物等用作酶源的二肽的制备方法。

1. 下述[1]~[3]中的任一项记载的蛋白质（不过，含有序列号 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质除外）：

[1]具有序列号 2 所示的氨基酸序列的蛋白质；

[2]由在序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列中，缺失、取代或添加了 1 个以上的氨基酸的氨基酸序列组成，且具有合成式（I）所示二肽的活性的蛋白质



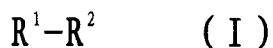
（式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸）；

[3]由与序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列具有 65%以上同源性的氨基酸序列组成、并且具有合成式（I）所示二肽的活性的蛋白质。

2. 下述[1]~[3]中的任一项记载的二肽合成用蛋白质：

[1]具有序列号 1 所示的氨基酸序列的二肽合成用蛋白质；

[2]由在序列号 1 所示的氨基酸序列中，缺失、取代或添加了 1 个以上的氨基酸的氨基酸序列组成，且具有合成式（I）所示二肽的活性的二肽合成用蛋白质



（式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸）；

[3]由与序列号 1 所示的氨基酸序列具有 65%以上同源性的氨基酸序列组成、并且具有合成式（I）所示二肽的活性的二肽合成用蛋白质。

3. 下述[1]~[3]中的任一项记载的 DNA（不过，除了序列号 3 所示的碱基序列组成的 DNA 之外）：

[1]编码权利要求 1 记载的蛋白质的 DNA；

[2]具有序列号 4 所示的碱基序列的 DNA；

[3]和具有与序列号 4 所示的碱基序列互补的碱基序列的 DNA 在严格条件下杂交、且编码具有合成式（I）所示二肽的活性的蛋白质的 DNA



（式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸）。

4. 含有权利要求 3 记载的 DNA 的重组 DNA。
5. 具有权利要求 4 记载的重组 DNA 的转化体。
6. 上述权利要求 5 记载的转化体，其中该转化体是以微生物作为宿主得到的转化体。
7. 权利要求 6 记载的转化体，其中所述微生物是属于埃希氏菌属 (*Escherichia*) 的微生物。
8. 权利要求 1 记载的蛋白质的制备方法，是将权利要求 5~7 任一项中记载的转化体在培养基中进行培养，在上述培养物中生成、积累权利要求 1 记载的蛋白质，从该培养物收集该蛋白质。
9. 权利要求 1 记载的蛋白质的制备方法，是将具有产生权利要求 1 记载的蛋白质的能力的微生物在培养基中进行培养，在培养物中生成、累积该蛋白质，从该培养物收集该蛋白质。
10. 权利要求 9 记载的制备方法，所述微生物是属于链霉菌属 (*Streptomyces*) 的微生物。
11. 权利要求 10 记载的制备方法，其中属于链霉菌属的微生物是具有产生白诺氏菌素能力的属于链霉菌属的微生物。
12. 权利要求 11 记载的制备方法，所述具有产生白诺氏菌素能力的属于链霉菌属的微生物是白诺氏链霉菌 (*Streptomyces alborus*) 或诺尔斯氏链霉菌 (*Streptomyces noursei*)。
13. 二肽的制备方法，使权利要求 1 记载的蛋白质或权利要求 2 记载的二肽合成用蛋白质、一种以上的氨基酸和 ATP 存在于水性介质中，在该介质中使式 (I)



(式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸) 所示二肽生成、积累，从该介质收集该二肽。

14. 二肽的制备方法，将从下述 [1] ~ [3] 中选出的培养物或该培养物的处理物作为酶源，使该酶源、一种以上的氨基酸存在于水性介质中，在该介质中使式 (I)



(式中, R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸)所示直链二肽生成、积累, 从该介质收集该二肽, 其中所述[1]-[3]为:

[1] 权利要求 5~7 中任一项记载的转化体的培养物或该培养物的处理物;

[2] 具有产生权利要求 1 记载的蛋白质的能力的微生物的培养物或该培养物的处理物;

[3] 具有产生权利要求 2 记载的二肽合成用蛋白质的能力的微生物的培养物或该培养物的处理物。

15. 权利要求 14 记载的制备方法, 所述具有产生权利要求 1 记载的蛋白质的能力的微生物是属于链霉菌属的微生物。

16. 权利要求 14 记载的制备方法, 所述具有产生权利要求 2 记载的二肽合成用蛋白质的能力的微生物是属于链霉菌属的微生物。

17. 权利要求 15 或 16 记载的制备方法, 所述属于链霉菌属的微生物是具有产生白诺氏菌素的能力的属于链霉菌属的微生物。

18. 权利要求 17 记载的制备方法, 所述具有产生白诺氏菌素的能力的属于链霉菌属的微生物是白诺氏链霉菌或诺尔斯氏链霉菌。

19. 权利要求 14 记载的制备方法, 具有产生权利要求 2 记载的二肽合成用蛋白质的能力的微生物, 是以编码权利要求 2 记载的二肽合成用蛋白质的 DNA 转化的微生物。

20. 权利要求 19 记载的制备方法, 以编码权利要求 2 记载的二肽合成用蛋白质的 DNA 转化的微生物是属于埃希氏菌属的微生物。

21. 权利要求 14~20 中任一项记载的制备方法, 其特征在于培养物的处理物是培养物的浓缩物、培养物的干燥物、离心分离培养物得到的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冻干物、该菌体的表面活性剂处理物、该菌体的超声波处理物、该菌体的机械性磨碎处理物、该菌体的溶剂处理物、该菌体的酶处理物、该菌体的蛋白质分级物、该菌体的固定化物或由该菌体抽提得到的酶标准品。

22. 权利要求 13~21 中任一项记载的制备方法, 其中, 一种以上的氨基酸是 L 型或 D 型氨基酸、甘氨酸、 β -丙氨酸或它们的衍生物。

23. 权利要求 13~22 中任一项记载的制备方法,其中二肽是式(II)所示的二肽



(式中, R^3 和 R^4 表示相同或不同的 L 型或 D 型氨基酸、甘氨酸、 β -丙氨酸或它们的衍生物)。

24. 权利要求 22 或 23 记载的制备方法,其中 L 型或 D 型氨基酸选自: 丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、 α -氨基丁酸、氮丝氨酸、茶氨酸、4-羟基脯氨酸、3-羟基脯氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸以及 6-重氨基-5-氧代正亮氨酸。

二肽的制备方法

技术领域

本发明涉及具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质；具有二肽合成活性的蛋白质的制备方法；使用具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的二肽制备方法；产生具有二肽合成活性的蛋白质、二肽合成用蛋白质的微生物或转化体；以及使用该微生物或转化体的二肽制备方法。

背景技术

作为大量合成二肽的方法，已知有化学合成法（液相法、固相法），酶合成法以及使用 DNA 重组法的生物合成法。目前，对于 50 个残基以上的长链肽，使用酶合成法或生物合成法，对于二肽，主要使用化学合成法和酶合成法。

由化学合成法进行二肽的合成中，官能团的保护·脱保护等操作是必需的，而且由于也会合成外消旋体，因此化学合成法不能说是一种经济而有效率的方法。此外，由于化学合成法使用大量的有机溶剂等，因此在环境卫生上也不是一种优选的方法。

关于由酶法进行二肽的合成，已知的有利用蛋白分解酶 (protease) 的逆反应的方法 (J. Biol. Chem., 119, 707-720 (1937))、利用耐热性氨酰基 t-RNA 合成酶的方法 (特开昭 58-146539 号公报、特开昭 58-209991 号公报、特开昭 58-209992 号公报、特开昭 59-106298 号公报)，利用非脂质体肽合成酶（以下称为 NRPS）的方法 (Chem. Biol., 7, 373-384 (2000)、FEBS Lett., 498, 42-45 (2001)、美国专利第 5795738 号、美国专利第 5652116 号)。

但是，在利用蛋白分解酶的逆反应的方法中，作为底物的氨基酸的官能团的保护和脱保护是必需的，存在难以实现肽形成反应的有效

化和对肽分解反应的抑制的问题。利用耐热性氨酰基 t-RNA 合成酶的方法存在酶的表达、难以抑制目的产物以外的副反应的问题。对于利用 NRPS 的方法, 由于酶分子很大, 难以使用 DNA 重组法表达该酶, 必需供给辅酶 4'-磷酸泛酰巯基乙胺 (4'-phosphopantetheine), 不能称之为有效的制备方法。

一方面, 已知有酶分子比 NRPS 小、不需要辅酶 4'-phosphopantetheine 的 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶 (γ -glutamylcysteine synthetase)、谷胱甘肽合成酶 (glutathione synthetase)、D-丙氨酸-D-丙氨酸 (D-Ala-D-Ala) 连接酶 (D-Ala-D-Ala ligase)、多聚- γ -谷氨酸合成酶 (poly- γ -glutamate synthetase) 等一系列的肽合成酶。这些肽几乎都是用 D-氨基酸作底物的, 此外, 因为具有催化在 γ 位的羧基形成肽键等特征, 所以不能用于在 L-氨基酸的 α 位羧基以肽键结合的二肽的合成。

已知具有通过在 L-氨基酸的 α 位羧基形成肽键的形成活性的只有来自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的微生物的二肽抗生素—杆菌溶素 (bacilysin) 合成酶。已知杆菌溶素合成酶具有合成杆菌溶素 (L-丙氨酸-L-抗英膜菌素, L-Ala-L-anticapsin) 和 L-丙氨酰基-L-丙氨酸的活性, 但尚不知道对其它的二肽的合成活性 (J. Ind. Microbiol., 2, 201-208 (1987)、Enzyme. Microbial. Technol., 29, 400-406 (2001))。

已知有一种微生物能产生两种由 2 个氨基酸连成的环状二肽 (二聚体哌嗪二酮 (DKP),) 结构的化合物 (J. Nat. Prod. 59, 293-296 (1996), Tetrahedron, 28, 2999 (1972), J. Appl. Microbiol., 86, 29-53 (1999))。据报道, 对于二聚体哌嗪二酮的生物合成, 在酸性疮痂链霉菌 (*Streptomyces acidiscabies*) 的 Thaxtomin 生物合成过程中通过 NRPS 合成环-(L-4-硝基色氨酰基-L-苯丙氨酸) (cyclo-(L-4-nitrotryptophyl-L-phenylalanine)) 结构 (Mol. Microbiol., 38, 794-804 (2000)), 以及芽孢杆菌属细菌 NRPS 的一部分调节 (module) 作用, 由苯丙氨酸和脯氨酸生成环(苯丙氨酰基脯

氨酰基脯氨酸 cyclo(phenylalanyl-proline) (J. Biol. Chem., 273, 22773- 22781)。

一方面，作为抗生素白诺氏菌素 (alboursin) 的产生株而为人所知的 *Streptomyces noursei* ATCC11455 株中存在与 NRPS 酶完全不相似的蛋白质 (albC 基因产物) 承担着合成环 (L-苯丙氨酰基-L-亮氨酸) [cyclo(L-phenylalanyl-L-leucine)] 的结构的作用。据报道导入 albC 基因的大肠杆菌和浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*) 的培养液中检测出由环二肽氧化酶作用得到的白诺氏菌素 [Chemistry & Biol., 9, 1355-1364 (2002)]，但无 albC 基因产物生成直二肽的报道。

发明内容

发明所要解决的课题

本发明的目的在于提供具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质；编码具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的 DNA；含该 DNA 的重组体 DNA、带有该重组体 DNA 的转化体；具有二肽合成活性的蛋白质的制备方法；使用具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的二肽的酶合成法；将具有产生二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质能力的微生物或转化体的培养物等用作酶源的二肽的制备方法。

用于解决课题的方法

本发明涉及以下的 (1)-(24)。

(1) 下述 [1]~[3] 中的任一项记载的蛋白质 (不过，由序列号 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质除外)：

[1] 具有序列号 2 所示的氨基酸序列的蛋白质；

[2] 由在序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列中，缺失、取代或添加了 1 个以上的氨基酸的氨基酸序列组成，且具有合成式 (I)



(式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸) 所示二肽的活性的蛋

白质；

[3]与序列号1或2所示的氨基酸序列具有65%以上同源性的氨基酸序列组成、并且具有合成式(I)所示二肽的活性的蛋白质。

(2) 下述[1]~[3]中的任一项记载的二肽合成用蛋白质：

[1]具有序列号1所示的氨基酸序列的二肽合成用蛋白质；

[2]由在序列号1所示的氨基酸序列中，缺失、取代或添加了1个以上的氨基酸的氨基酸序列组成，且具有合成式(I)



(式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸)所示二肽的活性的二肽合成用蛋白质；

[3]与序列号1所示的氨基酸序列具有65%以上同源性的氨基酸序列组成、并且具有合成式(I)所示二肽的活性的二肽合成用蛋白质。

(3) 下述[1]~[3]中的任一项记载的DNA(不过，除了序列号3所示的碱基序列组成的DNA之外)：

[1]编码上述(1)的蛋白质的DNA；

[2]具有序列号4所示的碱基序列的DNA；

[3]和具有与序列号4所示的碱基序列互补的碱基序列的DNA在严格条件下杂交、且编码具有合成式(I)



(式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸)所示二肽的活性的蛋白质的DNA。

(4) 含有上述(3)的DNA的重组DNA。

(5) 具有上述(4)的重组DNA的转化体。

(6) 上述(5)的转化体，其中该转化体是以微生物作为宿主而得到的转化体。

(7) 上述(6)的转化体，其中所述微生物是属于埃希氏菌属(*Escherichia*)的微生物。

(8) 在培养基中培养在上述(5)~(7)任一项中记载的转化体，使上述(1)的蛋白质在上述培养物中生成、积累，从该培养物收集该蛋

白质的上述(1)的蛋白质的制备方法。

(9) 在培养基中具有产生上述(1)的蛋白质的能力的微生物培养,使该蛋白质在上述培养基中生成、累积,从该培养物收集该蛋白质的上述(1)的蛋白质的制备方法。

(10) 上述(9)的制备方法,所述微生物是属于链霉菌属(*Streptomyces*)的微生物。

(11) 上述(10)的制备方法,其中属于链霉菌属的微生物是具有产生白诺氏菌素的能力的属于链霉菌属的微生物。

(12) 上述(11)的制备方法,所述具有产生白诺氏菌素的能力的属于链霉菌属的微生物是白诺氏链霉菌(*Streptomyces alborus*)或诺尔斯氏链霉菌(*Streptomyces noursei*)的微生物。

(13) 二肽的制备方法,使上述(1)的蛋白质或上述(2)的二肽合成用蛋白质、一种以上的氨基酸、和ATP存在于水性介质中,在该介质中使式(I)



(式中, R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸)所示二肽生成、积累,从该介质收集该二肽。

(14) 二肽的制备方法,从下述[1]~[3]中选出的培养物或该培养物的处理物作为酶源,使该酶源、一种以上的氨基酸存在于水性介质中,在该介质中使式(I)



(式中, R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸)所示二肽的蛋白质生成、积累,从该介质收集该二肽,其中

[1]上述(5)~(7)任一项记载的转化体的培养物或该培养物的处理物;

[2]具有产生上述(1)的蛋白质的能力的微生物的培养物或该培养物的处理物;

[3]具有产生上述(2)的二肽合成用蛋白质的能力的微生物的培养物或该培养物的处理物。

(15) 上述(14)的制备方法,所述具有产生上述(1)的蛋白质的能力的微生物是属于链霉菌属的微生物。

(16) 上述(14)的制备方法,所述具有产生上述(2)的二肽合成用蛋白质的能力的微生物是属于链霉菌属的微生物。

(17) 上述(15)或(16)的制备方法,所述属于链霉菌属的微生物是具有产生白诺氏菌素的能力的属于链霉菌属的微生物。

(18) 上述(17)的制备方法,所述具有产生白诺氏菌素的能力的属于链霉菌属的微生物是白诺氏链霉菌或诺尔斯氏链霉菌。

(19) 上述(14)的制备方法,具有产生上述(2)的二肽合成用蛋白质的能力的微生物,是以编码上述(2)的二肽合成用蛋白质的DNA转化的微生物。

(20) 上述(19)的制备方法,以编码上述(2)的二肽合成用蛋白质的DNA转化的微生物是属于埃希氏菌属的微生物。

(21) 上述(14)~(20)的任一项的制备方法,其特征在于培养物的处理物是培养物的浓缩物、培养物的干燥物、离心分离培养物得到的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冻干物、该菌体的表面活性剂处理物、该菌体的超声波处理物、该菌体的机械性粉碎处理物、该菌体的溶剂处理物、该菌体的酶处理物、该菌体的蛋白质分级物、该菌体的固定化物或由该菌体抽提得到的酶标准品。

(22) 上述(13)~(21)的任一项的制备方法,其中,一种以上的氨基酸是L型或D型氨基酸、甘氨酸、 β -丙氨酸或它们的衍生物。

(23) 上述(13)~(22)的任一项的制备方法,其中二肽是式(II)



(式中, R^3 和 R^4 表示相同或不同的L型或D型氨基酸、甘氨酸、 β -丙氨酸或它们的衍生物)所示的二肽。

(24) 上述(22)~(23)的任一项的制备方法,其中的L型或D型氨基酸选自:丙氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、蛋氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、天冬酰胺、酪氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、天冬氨酸、 α -

氨基丁酸、氨丝氨酸、茶氨酸、4-羟基脯氨酸、3-羟基脯氨酸、鸟氨酸、瓜氨酸以及 6-重氮基-5-氧代正亮氨酸。

发明的效果

按照本发明，可以提供具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质；编码具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的 DNA；含该 DNA 的重组体 DNA、带有该重组体 DNA 的转化体；具有二肽合成活性的蛋白质的制备方法；使用具有二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质的二肽的酶合成法；将具有产生二肽合成活性的蛋白质或二肽合成用蛋白质能力的微生物或转化体的培养物等用作酶源的二肽的制备方法。

附图说明

图 1: 表示具有二肽合成活性的蛋白质的表达质粒载体 pAL-nou 和 pAL-alb 的构建过程。

符号的说明

Amp^r: 氨苄青霉素抗性基因

lacI^q: 乳糖抑制子基因

albC: albC 基因或 albC 近似基因

具体实施方式

作为本发明的蛋白质，可列举：下述 [1]~[3] 记载的蛋白质（不过，由序列号 1 所示的氨基酸序列组成的蛋白质除外）：

[1] 具有序列号 2 所示的氨基酸序列的蛋白质；

[2] 由在序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列中，缺失、取代或添加了 1 个以上的氨基酸的氨基酸序列组成，且具有合成式 (I)



（式中， R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸）所示二肽的活性的蛋白质，和

[3]与序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列具有 65%以上、优选 80%以上、更优选 90%以上、进一步优选 95%以上、特别优选 98%以上、最优选 99%以上的同源性的氨基酸序列组成、并且具有合成式 (I) 所示二肽的活性的蛋白质。

此外,作为本发明的二肽合成用蛋白质,可列举下述[4]~[6]记载的二肽合成用蛋白质:

[4]具有序列号 1 所示的氨基酸序列的二肽合成用蛋白质;

[5]由在序列号 1 所示的氨基酸序列中,缺失、取代或添加了 1 个以上的氨基酸的氨基酸序列组成,且具有合成式 (I)



(式中, R^1 和 R^2 表示相同或不同的氨基酸)所示二肽的活性的二肽合成用蛋白质。

[6]与序列号 1 所示的氨基酸序列具有 65%以上、优选 80%以上、更优选 90%以上、进一步优选 95%以上、特别优选 98%以上、最优选 99%以上的同源性的氨基酸序列组成、并且具有合成式 (I) 所示二肽的活性的二肽合成用蛋白质。

下面,有时将上述本发明的蛋白质和二肽合成用蛋白质合称为本发明的蛋白质。

可以通过下述方法获得上述的缺失、取代或添加了 1 个以上的氨基酸的氨基酸序列组成的,且具有式 (I) 所示二肽的合成活性的蛋白质:采用 Molecular Cloning, A laboratory Manual, Third Edition, Cold Spring Harbor laboratory Press (1989) (以下简称为《分子克隆》第 3 版), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下称为分子生物学通用操作手册), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985) 等中记载的位点特异性突变导入法,通过向编码序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质的 DNA 导入位点特异性突变。

对于缺失、取代或添加的氨基酸数目没有限定，不过，通过上述的位点特异性突变法等众所周知的方法，能够取代或添加程度的数量、从1个到数十个，优选1~20个、更优选1~10个、更优选1~5个。

所说的在序列号1或2所示的氨基酸序列中，缺失、取代或添加1个以上的氨基酸，也可以是在同一个序列的任意位置上缺失、取代或添加1个或多个氨基酸。

作为可以进行氨基酸取代的氨基酸，可列举：例如在使用公知的比对软件比较序列号1或2所示的氨基酸序列时，不能在所有的氨基酸序列中保存的氨基酸。作为公知的比对软件，可以列举包括基因解析软件 Genetyx（软件开发株式会社）的比对解析软件。作为该解析软件的解析参数，可以使用默认值。

此外，作为可以缺失、或添加的氨基酸的位置，可以列举序列号1或2所示氨基酸序列的N末端侧以及C末端侧。

即使同时发生缺失、取代或添加也可以，不论缺失或添加的氨基酸为天然型和非天然型。作为天然型氨基酸，可以列举：L-丙氨酸、L-天冬酰胺、L-天冬氨酸、L-谷氨酰胺、L-谷氨酸、甘氨酸、L-组氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-赖氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-脯氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-色氨酸、L-酪氨酸、L-缬氨酸、L-半胱氨酸。

以下表示可以相互替代的氨基酸的例子。同一组中含有的氨基酸可以相互取代。

A组：亮氨酸、异亮氨酸、正亮氨酸、缬氨酸、正缬氨酸、丙氨酸、2-氨基丁酸、蛋氨酸、O-甲基丝氨酸、叔丁基甘氨酸、叔丁基丙氨酸、环己基丙氨酸

B组：天冬氨酸、谷氨酸、异天冬氨酸、异谷氨酸、2-氨基己氨酸、2-氨基辛二酸

C组：天冬酰胺、谷氨酰胺

D组：赖氨酸、精氨酸、鸟氨酸、2,4-二氨基丁酸、2,3-二氨基丙氨酸

E组：脯氨酸、3-羟基脯氨酸、4-羟基脯氨酸

F组：丝氨酸、苏氨酸、高丝氨酸

G组：苯丙氨酸、酪氨酸

此外，因为本发明的蛋白质具有式(I)所示二肽的合成活性，所以期望与序列号1或2所示的氨基酸序列具有65%以上、优选80%以上、更优选90%以上、进一步优选95%以上、特别优选98%以上、最优选99%以上的同源性。

氨基酸序列或碱基序列的同源性可以根据 Karlin and Altschul 的算法 BLAST (Pro. Natl. Aca. Sci. USA, 90, 5873 (1993)) 或 FASTA (Methods Enzymol., 183, 63 (1990)) 进行确定，根据该算法 BLAST，开发出称为 BLASTN 和 BLASTX 的程序 [J. Mol. Boil., 215, 403 (1990)]，在以基于 BLAST 的 BLASTN 分析碱基序列时，参数设为例如 score=100, wordlength=12。另外，在以基于 BLAST 的 BLASTX 分析氨基酸序列时，参数设为例如 score=50, wordlength=3。此外，使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时，使用各个程序的默认参数。这些分析方法的具体的方法是公知的 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。

作为确认本发明的蛋白质具有式(I)所示二肽合成活性的手段，例如可以列举：使用 DNA 重组法制备表达本发明的蛋白质的转化体，使用该转化体，制备本发明的蛋白质后，使本发明的蛋白质、1种以上的氨基酸、以及 ATP 存在于水性介质中，用 HPLC 等分析是否在上述水性介质中生成、累积上述式(I)所示的二肽的方法。

作为本发明的 DNA，可以列举下述[1]~[3]中记载的 DNA (不过，除了序列号3所示的碱基序列之外)：

[1] 编码序列号2所示氨基酸序列的蛋白质的 DNA；

[2] 具有序列号4所示的碱基序列的 DNA，和

[3] 和具有与序列号4所示的碱基序列互补的碱基序列的 DNA 在严格条件下杂交、且编码具有合成式(I)所示二肽的活性的蛋白质的 DNA。

此外，作为可用于本发明的式(I)所示二肽的制备方法中的 DNA，

除了上述 [1]~[3] 中记载的 DNA 之外, 可列举下述 [4]~[6] 记载的 DNA:

[4] 编码序列号 1 所示氨基酸的蛋白质的 DNA;

[5] 具有序列号 3 所示的碱基序列的 DNA, 和

[6] 和具有与序列号 3 所示的碱基序列互补的碱基序列的 DNA 在严格条件下杂交、且编码具有式 (I) 所示二肽的合成活性的蛋白质的 DNA。

这里所称的“杂交”是指 DNA 与具有特定碱基序列的 DNA 或该 DNA 的一部分杂交的步骤。因此, 具有该特定碱基序列的 DNA 或该 DNA 的一部分的碱基序列可用作 Northern 或 Southern 印迹分析的探针, 或也可以是可作为 PCR 分析的寡核苷酸引物使用的长度的 DNA。作为用作引物的 DNA, 可以是至少 100 个以上的碱基, 优选 200 个以上的碱基, 更优选 500 个以上的碱基的 DNA, 但是也可以是至少 10 个以上的碱基, 优选 15 个以上的 DNA。

DNA 的杂交实验的方法是众所周知的, 例如只要是本领域技术人员就可以按照本申请说明书, 确定杂交条件。这种杂交条件, 可以按照《分子克隆》(Molecular Cloning) 第 2 版、第 3 版 (2001 年), Methods for General and Molecular Bacteriology, ASM Press (1994), Immunology methods manual. Academic press (Molecular) 中记载的内容以及其它各种标准教科书进行。

上述所称的严格条件, 优选例如在含有 50% 甲酰胺, 5 × SSC 溶液 (750mM 氯化钠, 75mM 柠檬酸钠), 50mM 磷酸钠 (pH7.6), 5 × Denhardt 溶液, 10% 的硫酸葡聚糖和 20 μg/l 的变性的鲑精 DNA 的溶液中将固定了 DNA 的滤膜和探针 42℃ 下温育过夜后, 例如约 65℃ 下在 0.2 × SSC 溶液中洗涤该滤膜的条件, 但也可以使用严格度较低的条件。严格条件的变化可以通过甲酰胺的浓度调整 (甲酰胺的浓度越低严格度越低)、盐浓度和温度条件的变化而变化。作为低严格条件, 可以例举有例如在含有 6 × SSCE 溶液 (20 × SSCE 是, 3mol/l 氯化钠, 0.2mol/l 磷酸二氢钠, 0.02mol/l 的 EDTA, pH7.4), 0.5% SDS, 30% 甲酰胺, 100

$\mu\text{g}/1$ 的变性鲑精 DNA 的溶液于 37°C 下温育过夜后, 在 50°C 下用 $1 \times \text{SSC}$ 溶液, 0.1% SDS 洗涤的条件。此外, 作为更为低严格的条件, 可以例举有在上述低严格条件中, 用高盐浓度(例如: $5 \times \text{SSC}$)的溶液进行杂交后, 进行洗涤的条件。

上述各种条件也可以通过添加或改变用于抑制杂交实验的背景的封闭试剂来设定, 上述封闭试剂的添加, 也可以伴随杂交条件的改变进行以适应条件。

作为在上述严格条件下可以杂交的 DNA, 可以例举有例如当使用上述的 BLAST 或 FASTA 以上述参数等为基础进行计算时与序列号 3 或 4 表示的碱基序列至少具有 90% 以上, 优选 95% 以上, 再优选 98% 以上, 更为优选 99% 以上的同源性的 DNA。

与序列号 3 或 4 所示碱基序列 DNA 在杂交条件下杂交的 DNA, 是编码具有式 (I) 所示二肽的合成活性的蛋白质的情况, 例如, 可以通过如上所述, 使用重组法制备由该 DNA 所编码的蛋白质, 测定该蛋白质的活性来确认。

(i) 本发明的 DNA、和本发明的蛋白质或二肽的制备方法中使用的 DNA 的制备

本发明的 DNA、和本发明的蛋白质或二肽的制备方法(以下单独称为本发明的制备方法)中使用的 DNA, 例如可以使用根据序列号 3 或 4 所示的碱基序列设计得到的引物, 与属于链霉菌属的微生物的染色体 DNA 文库进行 southern 杂交, 使用根据序列号 3 或 4 所示的碱基序列设计得到的引物 DNA, 以属于链霉菌属的微生物的染色体 DNA 作为模板进行 PCR (PCR Protocol, Academic Press (1990)) 而获得。

此外, 也可以对各种基因序列数据库进行具有与编码序列号 1 或 2 表示的碱基序列的 DNA 具有 75% 以上, 优选 85% 以上, 更优选 90% 以上, 进一步优选具有 95% 以上, 特别优选 98% 以上, 最优选 99% 以上的同源性的序列的检索, 根据通过该检索得到的碱基序列, 由具有该碱基序列的生物的染色体 DNA、cDNA 文库等通过上述的方法等得到本发明的 DNA 或用于本发明的制备方法的 DNA。

将该 DNA 照原样或用适当的限制酶等切断，通过常规的方法重组到载体中，将获得的重组体 DNA 导入宿主细胞后，以通常使用的碱基序列分析方法，例如双脱氧法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 74, 5463 (1977)] 或使用 373A · DNA 测序仪 (Perkin Elmer 公司制) 等碱基序列分析装置进行分析，可以确定该 DNA 的碱基序列。

在测定碱基序列的结果为获得的 DNA 是部分长度 DNA 时，使用该部分长度 DNA 作为探针，通过对染色体 DNA 文库进行 Southern 杂交法等，可以获得全长 DNA。

进而，也可以基于测定的 DNA 的碱基序列，用 Perceptive Biosystems 公司制造的 8905 型 DNA 合成装置等通过化学合成制备目的 DNA。

作为如上所获得的 DNA，例如，可以列举具有序列号 3 或 4 所示的碱基序列的 DNA。

作为用于本发明的 DNA 的制备方法中使用的 DNAD 重组载体，可以例举 pBluescript II KS(+) (Stratagene 公司制)，pDIRECT [Nucleic Acids Res., 18, 6069 (1990)]，pCR-Script Amp SK (+) (Stratagene 公司制)、pT7 Blue (Novagene 公司制)、pCRII (Invitrogen 公司制) 和 pCR-TRAP (ジーンハンター公司制) 等。

作为宿主细胞，可以列举属于埃希氏菌属的微生物等，作为属于埃希氏菌属的微生物，例如可以列举：大肠杆菌 (*Escherichia coli*) XL1-Blue、大肠杆菌 XL2-Blue、大肠杆菌 DH1、大肠杆菌 MC1000、大肠杆菌 KY3276、大肠杆菌 W1485、大肠杆菌 JM109、大肠杆菌 HB101、大肠杆菌 No. 49、大肠杆菌 W3110、大肠杆菌 NY49、大肠杆菌 MP347、大肠杆菌 NM522、大肠杆菌 ME8415 等。

作为导入重组体 DNA 的方法，可以使用上述将 DNA 导入宿主细胞的方法中的任意一种，例如例举有使用钙离子的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69, 2110 (1972)]，原生质体方法 (特开昭 63-248394) 和电穿孔法 [Nucleic Acids Res, 16, 6127 (1988)] 等。

作为根据上述方法得到带有用于本发明的制备方法的 DNA 的微生物

物，例如可列举：含有具有序列号 3 所示的序列的 DNA 的重组子 DNA 的微生物大肠杆菌 NM522/pAL-nou。

(ii) 本发明的蛋白质和本发明的二肽合成用蛋白质的制备方法

本发明的蛋白质和本发明的二肽合成用蛋白质可以采用分子克隆第 3 版、Current Protocols in Molecular Biology 等中记载的方法，通过例如下述方法，使通过上述方法得到的本发明的 DNA 和用于本发明的制备方法的 DNA 在宿主细胞中表达、制造。

使用本发明的 DNA 或用于本发明的制备方法的 DNA 做为原料，根据需要制备成包括编码本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质的部分的适当长度的 DNA 片段。此外，通过碱基取代将编码该蛋白质的部分的碱基序列改变成最适于在宿主中表达的密码子，可以使该蛋白质的生产率提高。

通过在适当的表达载体的启动子的下游插入该 DNA 片段，制备重组型 DNA。

通过将该重组型 DNA 导入到适合该表达载体的宿主细胞中，可以获得生产本发明的蛋白质的转化体。

作为宿主细胞，可以是细菌、酵母、动物细胞、昆虫细胞等、植物细胞等，只要是能表达目的基因者都可以使用。可列举：优选属于细菌、更优选属于埃希氏菌属、芽孢杆菌属或棒杆菌属的微生物，更优选属于埃希氏菌属的微生物。

作为表达载体，是在生物体内可以自主复制或可以整合到染色体中的表达载体，可以使用在可以转录本发明的 DNA 或本发明的制备方法中使用的 DNA 的位置含有启动子的表达载体。

使用细菌等原核生物作为宿主细胞时，具有本发明的 DNA 或用于本发明的制备方法中的 DNA 的重组体 DNA，优选为可以在原核生物中自主复制的同时，由启动子、核糖体结合序列、本发明的 DNA 或本发明的制备方法中使用的 DNA、转录终止序列构成的重组型 DNA。也可以包含控制启动子的基因。

作为表达载体，可列举：pBTrp2、pBTac1、pBTac2(均为 biochem.roche.com 公司制)、pHelix(Roche Diagnostics 公司制)、pKK233-2(Amersham Pharmacia Biotech 公司制)、pSE280(Invitrogen 公司制)、pGEMEX-1(Promage 公司制)、pQE8(Qiagen 公司制)、pQE60(Qiagen 公司制)、pET-3(Novagene 公司制)、pKYP10(特开昭 58-110600)、pKYP200(Agric. Biol. Chem., 48,669(1984))、pLSA1(Agric. Biol.Chem., 53,277(1989))、pGEL1 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 82,4306(1985))、pBluescript II SK(+)、pBluescript II KS(-) (Stratagene 公司制)、pTrS30(由大肠杆菌 JM109/pTrS30(FERM BP-5407) 制)、pTrS32(由大肠杆菌 JM109/pTrS32(FERM BP-5408) 制备)、pPAC31(W098/12343)、pUC19 (Gene, 33,103(1985))、pSTV28(宝酒造公司制)、pUC118(宝酒造公司制)、pPA1(特开昭 63-233798)等。

作为启动子，只要是在大肠杆菌等宿主细胞中发挥作用的启动子可以是任意启动子。例如，可以使用例如 trp 启动子(P_{trp})启动子、lac 启动子(P_{lac})、 P_L 启动子、 P_R 启动子和 P_{SE} 启动子等源自大肠杆菌或噬菌体的启动子、SP01 启动子、SP02 启动子和 penP 启动子等。也可以使用 2 个 P_{trp} 线性串连的启动子、tac 启动子、lacT7 启动子和 let I 启动子等这样的人为设计和改变的启动子等。

另外，也可以使用用于在属于芽孢杆菌属的微生物中表达的 xylA 启动子 (Appl.Microbiol.Biotechnol., 35,594-599(1991))、或在属于棒杆菌属 (Corynebacterium) 的微生物中表达的 P54-6 启动子 (Appl.Microbiol.Biotechnol., 53,674-679(2000))、在属于链霉菌属的微生物中表达的 xylA 启动子 (Genetic Manipulation of Streptomyces:a Laboratory Manual:John Innes Foundation) 等。

优选使用核糖体结合序列 Shine-Dalgarno 序列与起始密码子之间的距离调节成适当距离(例如 6~18 个碱基)的质粒。

在本发明的 DNA 或与在用于本发明的制备方法中的 DNA 结合表达载体的重组体 DNA 中，转录终止序列并不总是必要的，但是优选在结

构基因的紧下方直接配置转录终止序列。

作为这样的重组体 DNA，可以例举有例如 pAL- nuo 和 pAL-alb。

作为原核生物，可以例举有埃希氏菌属，沙雷氏菌属 (*Serratia*)，芽孢杆菌属，短杆菌属 (*Brevibacterium*)，棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)，微杆菌属 (*Microbacterium*)，假单胞菌属 (*Pseudomonas*)，土壤杆菌属 (*Agrobacterium*)，脂环酸杆菌属 (*Alicyclobacillus*)，鱼腥蓝细菌属 (*Anabaena*)，组囊蓝细菌属 (*Anacystis*)，节杆菌属 (*Arthrobacter*)，固氮杆菌属 (*Azotobacter*)，着色菌属 (*Chromatium*)，欧文氏菌属 (*Erwinia*)，甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)，席蓝细菌属 (*Phormidium*)，红细菌属 (*Rhodobacter*)，红甲单胞菌属 (*Rhodopseudomonas*)，红螺菌属 (*Rhodospirillum*)，栅藻属 (*Scenedesmus*)，链霉菌属 (*Streptomyces*)，聚球蓝细菌属 (*Synechococcus*) 和发酵单胞菌属 (*Zymomonas*)。例如是大肠杆菌 XL1 - Blue，大肠杆菌 XL2 - Blue，大肠杆菌 DH1，大肠杆菌 DH5 α ，大肠杆菌 MC1000，大肠杆菌 KY 3276，大肠杆菌 W1485，大肠杆菌 JM109，大肠杆菌 HB101，大肠杆菌 No. 49，大肠杆菌 W3110，大肠杆菌 NY49，大肠杆菌 MP347，大肠杆菌 NM522，枯草芽孢杆菌 ATCC 33712，巨大芽孢杆菌，芽孢杆菌属种 (*Bacillus* sp.) FERM BP - 6030，解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)，地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)，短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*)，产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*)，未成熟短杆菌 (*Brevibacterium immariophilum*) ATCC 14068，解糖短杆菌 (*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC 14066，黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067，产乳酸棒杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC 13869，谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032，谷氨酸棒杆菌 ATCC 14297，嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870，嗜氨微杆菌 (*Microbacterium ammoniophilum*) ATCC

15354, 无花果沙雷氏菌 (*Serratia ficaria*), 居泉沙雷氏菌 (*Serratia fonticola*), 液化沙雷氏菌 (*Serratia liquefaciens*), 粘质沙雷氏菌 (*Serratia marcescens*), 假单胞菌属种 (*Pseudomonas* sp.) D-0110, 放射形土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*), 发根土壤杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*), 悬钩子土壤杆菌 (*Agrobacterium rubi*), 柱孢鱼腥蓝细菌 (*Anabaena cylindrica*), 桶形鱼腥蓝细菌 (*Anabaena doliolum*), 水华鱼腥蓝细菌 (*Anabaena flos-aquae*), 金黄节杆菌 (*Arthrobacter aurescens*), 柠檬节杆菌 (*Arthrobacter citreus*), 球形节杆菌 (*Arthrobacter globiformis*), *Arthrobacter hydrocarboglutamicus*, 迈索尔节杆菌 (*Arthrobacter mysorens*), 烟草节杆菌 (*Arthrobacter nicotianae*), 石蜡节杆菌 (*Arthrobacter paraffineus*), 原玻璃蝇节杆菌 (*Arthrobacter protophormiae*), 玫瑰色石蜡节杆菌 (*Arthrobacter roseoparaffinus*), 硫磺节杆菌 (*Arthrobacter sulfureus*), 产脲节杆菌 (*Arthrobacter ureafaciens*), 巴氏着色菌 (*Chromatium buderi*), 微温着色菌 (*Chromatium tepidum*), 酒色着色菌 (*Chromatium vinosum*), 沃氏着色菌 (*Chromatium warmingii*), *Chromatium fluviatile*, 噬夏孢欧文氏菌 (*Erwinia uredovora*), 胡萝卜软腐欧文氏菌 (*Erwinia carotovora*), 菠萝欧文氏菌 (*Erwinia ananas*), 草生欧文氏菌 (*Erwinia herbicola*), *Erwinia punctata*, *Erwinia terreus*, 罗得西亚甲基杆菌 (*Methylobacterium rhodesianum*), 扭脱甲基杆菌 (*Methylobacterium extorquens*), 席蓝细菌属种 (*Phormidium* sp.) ATCC 29409, 荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*), 类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*), 生芽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas blastica*), 海红菌 (*Rhodopseudomonas marina*), 血色红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*), 深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*), 需盐红螺菌 (*Rhodospirillum sallexigens*), 盐场红螺菌 (*Rhodospirillum salinarium*), 产二素链霉菌 (*Streptomyces ambofaciens*), 金霉素链霉菌 (*Streptomyces*

aureofaciens), 金色链霉菌 (*Streptomyces aureus*), 杀真菌素链霉菌 (*Streptomyces fungicidicus*), 灰产色链霉菌 (*Streptomyces griseochromogenes*), 灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*), 浅青紫链霉菌 (*Streptomyces lividans*), 橄榄灰链霉菌 (*Streptomyces olivogriseus*), 枝链霉菌 (*Streptomyces rameus*), 田无链霉菌 (*Streptomyces tanashiensis*), 酒红链霉菌 (*Streptomyces vinaceus*) 和运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 等, 优选属于埃希氏菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属或棒状杆菌属的微生物。

作为导入重组体 DNA 的方法, 可以使用上述将 DNA 导入宿主细胞的方法中的任意一种, 例如例举有使用钙离子的方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA 69, 2110 (1972)], 原生质体方法 (特开昭 63-248394), 电穿孔法 [Nucleic Acids Res, 16, 6127 (1988)] 等。

使用酵母菌株作为宿主细胞时, 作为表达载体, 可列举: YEp13 (ATCC37115)、Yep24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15 等。

作为启动子, 只要能在酵母菌株中发挥功能者即可使用, 例如: PH05 启动子、PGK 启动子、GAP 启动子、ADH 启动子、gal1 启动子、gal10 启动子、热休克多肽启动子、MF α 1 启动子、CUP1 启动子等启动子。

作为宿主细胞, 可列举: 酵母属 (*Saccharomyces*)、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、丝孢酵母属 (*Trichosporon*)、许旺氏酵母属 (*Schwanniomyces*)、毕赤酵母属 (*Pichia*)、假丝酵母属 (*Candida*) 等。具体可列举: 啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*)、茁芽丝孢酵母 (*Trichosporon pullulans*)、河岸许旺氏酵母 (*Schwanniomyces alluvius*)、巴斯德毕赤氏酵母 (*Pichia pastoris*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 等。

作为导入重组体 DNA 的方法, 可以使用上述将 DNA 导入酵母的方

法中的任意一种，例如例举有使用电穿孔法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、球形原生质体方法 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)、醋酸锂法 [J. Bacteriol. 153, 163 (1983)] 等。

以动物细胞作为宿主时，作为表达载体，例如可以使用：pcDNA1、pcDM8 (购自 Funakoshi 公司)、pAGE107 (特开平 3-22979)、pAS3-3 (特开平 2-227075)、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp (Invitrogen 公司制)、pREP4 (Invitrogen 公司制)、pAGE103 [J. Biochem, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pAMo、pAMoA 等。

作为启动子，只要能在动物细胞中发挥功能即可使用，例如：巨细胞病毒 (CMV) 的 IE (immediate early) 基因的启动子、SV40 早期启动子或金属硫蛋白启动子、逆转录病毒启动子、热休克启动子、SR α 启动子等。此外，也可以将启动子与人 CMV 的 IE 基因的增强子一起使用。

作为宿主细胞，可列举：小鼠骨髓瘤细胞、大鼠骨髓瘤细胞、小鼠杂交瘤细胞、人细胞的 Namalwa 细胞或 Namalwa KJM-1 细胞、人胚肾细胞、人白血病细胞、非洲绿猴肾脏细胞、中国仓鼠细胞 CHO 细胞、HBT5637 (特开昭 63-299) 等。

作为小鼠骨髓瘤细胞，可列举 SP2/0、NS0 等；作为大鼠骨髓瘤细胞，可列举 YB2/0 等、作为人胚肾细胞可列举 HEK293 (ATCC CR1-1573)，作为人白血病细胞可列举 BALL-1 等、作为非洲绿猴肾脏细胞，可列举 COS-1、COS-7 等。

作为导入重组体 DNA 的方法，可以使用上述将 DNA 导入动物的方法中的任意一种，例如例举有使用电穿孔法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、磷酸钙法 (特开平 2-227075)、脂质体转染法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 7413 (1987)]、Virology, 52, 456 (1973) 中记载的方法等。

使用昆虫细胞作为宿主细胞时，例如可根据 Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W.H. Freeman and

Company, New York (1992), Current Protocols in Molecular Biology, Molecular Biology, A Laboratory Manual, Bio/Technology, 6, 47(1988)等中记载的方法生产蛋白质。

即, 将重组基因导入载体和杆状病毒(Baculovirus)共导入到昆虫细胞中, 从昆虫细胞培养上清中得到重组病毒之后, 再用重组病毒感染昆虫细胞, 生产蛋白质。

作为在该方法中使用的基因导入载体, 例如可以是 pVL1392、pVL1393、pBlueBacIII(均为 Invitrogen 公司制)等。

作为杆状病毒, 例如, 可以使用可感染夜盗蛾科昆虫的苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等。

作为昆虫细胞, 可以使用草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)的卵巢细胞、银纹夜蛾(Trichoplusia ni)的卵细胞, 来自蚕的卵细胞的培养细胞等。

作为草地贪夜蛾的卵细胞, 可列举 Sf9、Sf21(Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual)等, 作为银纹夜蛾的卵细胞的培养细胞, 可列举 High5、BTI-TN-5B1-4(Invitrogen 公司制)等, 作为来自蚕的卵细胞, 可列举家蚕(Bombyx mori) N4 等。

作为为了制备重组病毒而向昆虫细胞中共同导入上述重组基因导入载体和上述杆状病毒的方法, 可列举磷酸钙法(特开平 2-227075)、脂质体转染[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413(1987)]等。

使用植物细胞作为宿主细胞时, 作为表达载体可使用例如: Ti 质粒、烟草花叶病毒载体等。

作为启动子, 只要是能在植物细胞中发挥功能者即可使用, 例如: 花椰菜花叶病毒 CaMV 的 35S 启动子、RiceAct1 启动子等。

作为宿主细胞, 可列举: 烟草、马铃薯、西红柿、胡萝卜、大豆、油菜、苜蓿、水稻、小麦、大麦等植物细胞。

作为重组载体的导入方法, 只要是能向植物细胞中导入的方法即可使用, 例如: 使用土壤杆菌(Agrobacterium)的方法(特开昭

59-140885、特开昭 60-70080、W094/00977)、电穿孔法(特开昭 60-251887)、粒子枪(基因枪)方法((日本)专利第 2606856、(日本)专利第 2517813)等。

通过酵母、动物细胞、昆虫细胞或植物细胞进行表达时,可以得到添加了糖或糖链的蛋白质。

将如上得到的转化体在培养基中进行培养,使本发明的蛋白质在培养物中生成并累积,通过从该培养物中收集,可制造该蛋白质。

作为用于制造本发明的蛋白质的上述转化体的宿主,可以是细菌、酵母动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等任何一种细胞,优选细菌、更优选属于埃希氏菌属的微生物,更优选属于大肠杆菌的微生物。

在培养基中培养上述转化体的方法,可按照在宿主培养中通常使用的方法进行。

作为培养以大肠杆菌等原核生物或酵母等真核生物作为宿主得到的转化体的培养基,只要是含有该微生物能够同化的碳源、氮源、无机盐类等,能有效地培养转化体,可以使用天然培养基、合成培养基中的任意一种。

作为碳源,只要是该微生物可以同化的碳源即可,可以使用葡萄糖、果糖、蔗糖、含有它们的糖蜜、淀粉和淀粉水解产物等碳水化合物;醋酸和丙酸等有机酸;乙醇和丙醇等醇类。

作为氮源,可以使用氨、氯化铵、硫酸铵、醋酸铵和磷酸铵等有机酸或无机酸铵盐、含氮化合物、以及蛋白胨、肉膏、酵母提取物、玉米浆、酪蛋白水解产物、豆饼、豆饼水解产物和各种发酵的微生物菌体和其消化的产物。

作为无机盐,可以使用磷酸二氢钾、磷酸氢二钾、磷酸镁、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、硫酸铜和碳酸钙等。

通常在振荡培养或在深度通气搅拌培养等需氧条件下进行培养。培养温度可以为 15~40℃,培养时间通常是 5 小时至 7 天。在培养过程中,将 pH 维持在 3.0~9.0。使用无机酸或有机酸、碱溶液、尿素、碳酸钙、氨等进行 pH 调节。

此外，根据培养需要，在培养过程中还可以向培养基中加入氨基青霉素和四环素等抗生素。

当培养经采用诱导性启动子作为启动子的表达载体转化的微生物时，根据需要，还可以向培养基中加入诱导物。例如，在培养经采用 lac 启动子的表达载体转化的微生物时，可以向培养基中加入异丙基- β -D-硫代吡喃半乳糖苷等；在培养经采用 trp 启动子的表达载体转化的微生物时，可以向培养基中加入吲哚丙烯酸等。

作为培养以动物细胞作为宿主得到的转化体的培养基，通常可以使用 RPMI1640 培养基 [J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)]、Eagle 氏 MEM 培养基 [Science, 122, 501 (1952)]、DMEM 培养基 [Virology, 8, 396 (1959)]、199 培养基 [Proc. Soc. Biol. Med., 73, 1 (1950)]，此外，还可以使用向这些培养基中添加了胎牛血清等的培养基。

培养通常在 pH6-8、25-40℃，5%CO₂ 存在下等的条件下进行 1-7 天。

此外，对应于培养过程中的需要，也可以向培养基中添加卡那霉素、青霉素、链霉素等抗生素。

作为培养以昆虫细胞作为宿主得到的转化体的培养基，通常可以使用 TNM-FH (Pharming 公司制)、Sf-900II SFM 培养基 (Life Technologies 公司制) ExCell1400、ExCell1405 (均为 JRH Bio Sciences 公司制)、Grace's Insect Medium [Naure, 195, 788 (1962)] 等。

培养通常在 pH6-7、25-30℃ 等的条件下进行 1-5 天。

此外，培养过程中，根据需要，也可以向培养基中添加庆大霉素等抗生素。

可以将植物细胞作为宿主得到转化体，作为细胞，或使之分化为植物的细胞或器官进行培养。作为培养该转化体的培养基，通常可以使用 Murashige Skoog (MS) 培养基、White 培养基、或向这些培养基中添加了二氯苯氧乙酸 (オーキシシン)、细胞因子等、植物激素的培养基等。

培养通常在 pH5-9、20-40℃ 等的条件下进行 3-60 天。

此外，对应于培养过程中的需要，也可以向培养基中添加卡那霉

素、潮霉素等抗生素。

如上所述，可以按照常规的培养方法，培养带有与表达载体连接的本发明的DNA或用于本发明的制备方法的DNA的微生物、昆虫细胞、动物细胞、或来自植物细胞的转化体，使本发明的蛋白质生成并累积，从该培养物收集该蛋白质，制造该蛋白质。

作为本发明的蛋白质的生产方法有在宿主细胞内生产的方法、向宿主细胞外分泌的方法、或在宿主细胞外膜上生产的方法，可以根据选择的方法，选择使用的宿主细胞，改变生产的蛋白质的结构。

本发明的蛋白质在宿主细胞内或宿主细胞外膜上生产时，参照Paulson等人的方法[J. Biol. Chem. 264, 17619 (1989)], Lowe等人的方法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989), Genes Develop., 4, 1288 (1990)], 或特开平 05-336963、W094/23021 等记载的方法，能够使该蛋白质积极地向细胞外分泌。

即，使用基因重组的方法，通过以在含有本发明蛋白质的活性部位的蛋白质的前面添加信号肽的形式进行生产，能够使该蛋白质积极地向宿主细胞外分泌。

此外，参照特开平 2-227075 记载的方法，利用二氢叶酸还原酶基因等基因扩增系统能够使产量提高。

再通过使导入基因的动物或植物的细胞再分化，制备导入了基因的动物个体（转基因的非人动物）或植物个体（转基因的植物），可以使用这些个体制造本发明的蛋白质。

生产本发明的蛋白质的转化体是动物个体或植物个体时，可以按照常规的培养方法，培养或栽培，使该蛋白质生成并累积，从该动物个体或植物个体收集该蛋白质，制造该蛋白质。

作为使用动物个体制造本发明的蛋白质的方法，可列举例如按照公知的方法[Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996), Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996), Bio/Technology, 9, 830 (1991)], 导入基因，在得到的动物中生产本发明的蛋白质。

是动物个体的情况下，可以例如可以饲养导入了本发明的DNA或

用于本发明的制备方法的 DNA 的转基因的非人动物，使本发明的蛋白质在该动物中生成并累积，从该动物中收集该蛋白质，制造该蛋白质。作为在该动物中的生成、累积的场所，可列举该动物的乳汁（特开昭 63-309192）、卵（蛋）等。作为此时使用的启动子，只要是在动物中具有功能的即可使用。例如：适宜使用乳腺细胞特异性启动子： α 酪蛋白启动子、 β 酪蛋白启动子、 β 乳球蛋白启动子、乳清酸性蛋白质启动子等。

使用植物个体作为本发明的蛋白质的制备方法，可列举例如，参照公知方法[组织培养，20（1994），组织培养，21（1995），Trends Biotechnol., 15, 45（1997）]栽培导入了编码本发明的蛋白质的 DNA 的转基因植物。使该蛋白质在该植物中生成并累积，从该植物中收集该蛋白质，制造该蛋白质。

作为分离、纯化使用生产本发明的蛋白质的转化体制造本发明的蛋白质的方法，可以使用常规的酶的分、纯化方法。

例如：本发明的蛋白质以在细胞内容解状态生产时，在培养结束后，通过离心分离回收细胞，在水类缓冲液中悬浮后，通过超声波破碎仪、弗氏压釜、マントンガウリン匀浆机、珠粒磨碎机等破碎细胞，得到无细胞提取液。

由通过离心分离该无细胞提取液得到的上清，单独或组合使用下述常规的酶的分、纯化方法，能够得到纯化的标准品，所述的方法包括：溶媒提取法、通过硫酸铵的盐析法、脱盐法，以有机溶剂的沉淀法、使用二乙基氨基乙基（DEAE）-Sephacel、DIAION HPA-75（三菱化成公司制）等树脂的阴离子交换层析法、使用 S-Sepharose FF（Pharmacia 公司制）等的树脂的阳离子交换层析法，使用 butyl-Sepharose、phenyl-Sepharose 等树脂的疏水性层析法、使用分子筛的凝胶过滤法、亲和层析法、层析聚焦法、等电点电泳等电泳方法等。

此外，该蛋白质在细胞内形成包涵体进行生产时，同样回收细胞后破碎，由通过离心分离的得到的沉淀级分中通过常规方法回收该蛋

白质后，用蛋白质变性剂溶解该蛋白质的包涵体。

可以将该溶解液在不含蛋白质变性剂或蛋白质变性剂的浓度不使蛋白质变性程度的稀释的溶液中稀释或透析，使该蛋白质形成正常的立体结构后，通过与上述同样的分离纯化方法得到纯化的标准品。

可以在本发明的蛋白质或其糖修饰体等的衍生物向细胞外分泌时，回收培养上清中的该蛋白质或其糖附加体等的衍生物。

即，将该培养物通过与上述相同的离心分离等方法得到可溶性级分，从该可溶性级分通过使用与上述相同的分离方法得到纯化的标准品。

作为这样得到的蛋白质，可列举例如序列号 1 或 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

此外，作为本发明的蛋白质与其它蛋白质的融合蛋白质的生产，可以利用对融合蛋白质具有亲和性的物质的亲和层析进行纯化。

作为被融合的蛋白质，可列举： β -半乳糖苷酶、蛋白质 A、蛋白质 A 的 IgG 结合区域、氯霉素乙酰基转移酶、多聚精氨酸、多聚谷氨酸、蛋白质 G、麦芽糖结合蛋白质、谷胱甘肽 S 转移酶、多聚组氨酸链 (His-tag)、S 肽、DNA 结合蛋白质结构域、Tac 抗原、硫氧化还原蛋白、绿色荧光蛋白质、FLAG 肽、以及任何抗体表位 [山川彰夫，实验医学，13，469-474 (1995)]。

作为对上述被融合的蛋白质具有亲和性的物质，可列举识别 β -半乳糖苷酶、蛋白质 A、蛋白质 A 的 IgG 结合区域、氯霉素乙酰基转移酶、多聚精氨酸、多聚谷氨酸、蛋白质 G、麦芽糖结合蛋白质、谷胱甘肽 S 转移酶、多聚组氨酸链 (His-tag)、S 肽、DNA 结合蛋白质结构域、Tac 抗原、硫氧化还原蛋白、绿色荧光蛋白质、FLAG 肽、以及任何抗体表位的抗体，例如：IgG。

此外，根据上述得到的蛋白质的氨基酸信息，可以通过 Fmoc 法 (9-芴甲氧羰基法)、tBoc (叔丁氧羰基法) 等化学合成方法，制造本发明的蛋白质，此外，也可以利用 Advanced ChemTech 公司，Perkin Elmer 公司、Pharmacia 公司、Protein Technology Instrument 公

司、Synthecell-Vega公司、PerSeptive公司、岛津制作所等的肽合成仪，进行化学合成。

(iii) 本发明的二肽的制备方法

(1) 酶的制备方法

作为二肽酶的制备方法，可列举使本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质、一种以上的氨基酸、以及ATP存在于水性介质中，在该介质中生成、累积式(I)所示的二肽，从该介质中回收该二肽的方法。

在上述制备方法中，作为用作底物的1种以上的氨基酸，优选1或2种氨基酸，可列举：选自L型或D型氨基酸、甘氨酸(Gly)、 β -丙氨酸(β Ala)及其衍生物的氨基酸，优选L-氨基酸，从由Gly和 β -丙氨酸及其衍生物组成的组中选出的氨基酸，只要是该氨基酸，也可以使用任何氨基酸的任何组合。作为L型或D型氨基酸，可列举丙氨酸(Ala)、谷氨酰胺(Gln)、谷氨酸(Glu)、缬氨酸(Val)、亮氨酸(Leu)、异亮氨酸(Ile)、脯氨酸(Pro)、苯丙氨酸(Phe)、色氨酸(Trp)、蛋氨酸(Met)、丝氨酸(Ser)、苏氨酸(Thr)、半胱氨酸(Cys)、天冬酰胺(Asn)、酪氨酸(Tyr)、赖氨酸(Lys)、精氨酸(Arg)、组氨酸(His)、天冬氨酸(Asp)和 α -氨基丁酸(α -AB)、重氮丝氨酸(Azaserine)、茶氨酸(theanine)、4-羟基脯氨酸(4-HYP)、3-羟基脯氨酸(3-HYP)、鸟氨酸(Orm)、瓜氨酸(Cit)、6-重氮基-5-氧代正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-norleucine)等。作为L型的氨基酸，可以例举L-Ala、L-Gln、L-Glu、Gly、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Pro、L-Phe、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Asn、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L-His、L-Asp和L- α -AB、L-Azaserine、L-theanine、L-4-HYP、L-3-HYP、L-Orm、L-Cit、L-6-diazo-5-oxo-norleucine等。

作为氨基酸的衍生物，可以例举有羟氨基酸(β -羟谷氨酰胺、 β -羟谷氨酸、 γ -羟谷氨酸、 α -羟甘氨酸、 β -羟缬氨酸、 γ -羟缬氨酸、 β -羟亮氨酸、 γ -羟亮氨酸、 δ -羟亮氨酸、 β -羟异亮氨酸、 γ -羟异亮氨酸、3-羟脯氨酸、4-羟脯氨酸、 β -羟苯丙氨酸、3,4-二羟苯丙氨酸、2,4,5三羟苯丙氨酸、 β -羟色氨酸、5-羟色氨酸、 α -羟蛋氨酸、

β -羟丝氨酸、 γ -羟苏氨酸、S-羟半胱氨酸、 β -羟天冬酰胺、 β -羟酪氨酸、 β -羟赖氨酸、 γ -羟赖氨酸、 δ -羟赖氨酸、N-羟赖氨酸、 β -羟精氨酸、 δ -羟精氨酸、N-羟精氨酸、 β -羟组氨酸、 β -羟天冬氨酸、 β -羟鸟氨酸、 γ -羟鸟氨酸、N-羟鸟氨酸)、N-甲基-氨基酸(N-甲基-丙氨酸、N-甲基-谷氨酰胺、N-甲基-谷氨酸、N-甲基-甘氨酸、N-甲基-缬氨酸、N-甲基-亮氨酸、N-甲基-异亮氨酸、N-甲基-脯氨酸、N-甲基-苯丙氨酸、N-甲基-色氨酸、N-甲基-蛋氨酸、N-甲基-丝氨酸、N-甲基-苏氨酸、N-甲基-半胱氨酸、N-甲基-天冬酰胺、N-甲基-酪氨酸、N-甲基-赖氨酸、N-甲基-精氨酸、N-甲基-组氨酸、N-甲基-天冬氨酸、N-甲基-鸟氨酸)等。

作为在上述制备方法中使用的更优选的1种或2种氨基酸，可列举选自L-Ala、L-Leu以及L-Phe中的1种或2种氨基酸，更优选选自L-Ala、L-Leu以及L-Phe中的1种氨基酸，或由L-Leu和L-Phe组成的2种氨基酸。

上述制备方法中使用本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质按照使用的底物氨基酸每1mg添加0.01-100mg，优选添加0.1mg-10mg。

在上述制备方法中，在初始或反应过程中向水性介质中添加作为底物使用的氨基酸使之以总量计达到0.1-500g/L的浓度、优选0.2~200g/L的浓度。

作为在上述制备方法中使用的水性介质，只要不抑制二肽的生成反应，可以为任何成分、组成的水性介质，可以例举有水，磷酸盐缓冲液，碳酸盐缓冲液，醋酸盐缓冲液，硼酸盐缓冲液，柠檬酸盐缓冲液和Tris缓冲液等缓冲液。或，甲醇、乙醇等醇类，醋酸乙酯等酯类，丙酮等酮类，和乙酰胺等酰胺类等。

二肽的生成反应，于水性介质中，为pH5-11，优选pH6-10，20-50℃，优选25-45℃的条件下进行2~150小时，优选进行6~120小时。

作为以上述制备方法制备的二肽，可以例举有由上述式(I)表示的二肽，优选，式中， R^1 和 R^2 相同或不同，为L型或D型的氨基酸、甘氨酸、 β -丙氨酸或其衍生物的二肽，优选L型的氨基酸、甘氨酸、

β -丙氨酸或其衍生物的二肽。

作为L型的氨基酸和氨基酸的衍生物，可以列举前述物质。

作为以上述方法制造的，更优选的二肽，可列举L-亮氨酰基-L-苯丙氨酸、L-苯丙氨酰基-L-亮氨酸、L-丙氨酰基-L-丙氨酸、L-亮氨酰基-L-亮氨酸和L-苯丙氨酰基-L-苯丙氨酸等。

(2) 使用转化体、或微生物的培养物、或培养物的处理物作为酶源的制备方法

作为使用转化体、或微生物的培养物、或培养物的处理物作为酶源的制备方法，可列举将具有产生本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质的能力的转化体、或具有产生本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质的能力的微生物的培养物或培养物的处理物作为酶源，使该酶源以及一种以上的氨基酸存在于水性介质中，在该介质中生成、累积式(I)所示的二肽，从该介质中回收该二肽的方法的二肽的制备方法。

作为在上述制备方法中使用的转化体，可以列举能够通过上述(ii)的方法制造的、生产本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质的转化体。作为该转化体的宿主，可列举细菌、酵母、动物细胞、昆虫细胞等、植物细胞等，优选细菌，更优选属于埃希氏菌属、芽孢杆菌属、链霉菌属或棒杆菌属的微生物。

作为属于埃希氏菌属的微生物，优选可列举属于大肠杆菌的微生物，作为属于芽孢杆菌属的微生物，优选可列举属于枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)的微生物，作为属于链霉菌属的微生物，优选可以列举浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*)，作为属于棒杆菌属的微生物，可列举属于谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)的微生物。

用于上述制备方法的微生物，只要是具有产生本发明的蛋白质或二肽合成用蛋白质能力的微生物，可以是任何微生物，优选属于链霉菌属的微生物，更优选具有白诺氏菌素合成活性的属于链霉菌属的微生物，进一步优选属于选自白诺氏链霉菌(*Streptomyces alborus*)

或诺尔斯氏链霉菌 (*Streptomyces noursei*) 的种的微生物, 最优选白诺氏链霉菌 IF014147、诺尔斯氏链霉菌 ATCC11455 或 IF015452 株。

作为培养物的处理物, 只要维持与培养物相同的活性, 可以是实施了任何公知处理的培养物的处理物, 作为该处理物, 可以例举有培养物的浓缩物、培养物的干燥物、通过离心分离培养物获得的菌体、该菌体的干燥物、该菌体的冷冻干燥物、该菌体的表面活性剂的处理物、该菌体的溶剂的处理物、该菌体的酶处理物和该菌体的固定化物等含有活菌体的处理物, 以及这些菌体的超声波处理物、该菌体的机械研磨处理物、该菌体的蛋白质级分物、以及从该菌体中提取纯化获得的酶标准品等。

在上述制备方法中, 用作底物的氨基酸的种类、使用浓度以及添加时间, 以及生产的二肽与上述 (iii) 的 (1) 的基于酶的制备方法相同。

此外, 作为以微生物的培养物或该培养物的处理物作为酶源的制备方法中使用的水性介质, 可以使用添加上述 (iii) 的 (1) 的基于酶的制备方法中使用的水性介质、作为酶源使用的转化体的或微生物的培养液也可以作为水性介质。

在上述制备方法中, 根据需要, 作为 ATP 的供给源, ATP 或转化体或微生物代谢能够产生 ATP 的化合物, 可以向水性介质中加入例如: 葡萄糖之类的糖类、乙醇之类的醇类、醋酸之类的有机酸类等。

此外, 根据需要, 也可以添加表面活性剂或有机溶剂。作为表面活性剂, 可以使用例如聚氧乙烯十八烷基胺 (例如 Nymeen S-215, 日本油脂公司制) 等非离子表面活性剂, 例如溴化十六烷基三甲铵和烷基二甲基苄基氯化铵 (例如 Cation F2-40E, 日本油脂公司制) 等阳离子表面活性剂, 例如月桂酰肌氨酸酯 (ザルコシネート) 等阴离子表面活性剂, 和例如烷基二甲胺 (例如叔胺 FB, 日本油脂公司制) 等叔胺等, 只要能促进二肽的生成任何物质即可, 可以单独使用或也可以多种混合使用。表面活性剂通常以 0.1 至 50 g/l 的浓度使用。作为有机溶剂, 可例举有二甲苯、甲苯、脂族醇、丙酮、醋酸乙酯等, 通

常以 0.1 至 50ml/l 的浓度使用。

以培养物或该培养物的处理物作为酶源使用时，该酶源的量因所用的该酶源的比活性等而不同，例如：每 1mg 用作底物的氨基酸以湿菌体的重量计为 5-1000mg，优选 10-400mg 添加。

二肽的生成反应，于水性介质中，pH5-11，优选 pH6-10，20-65℃，优选 25-55℃，更优选 30-45℃的条件下通常进行 1 分钟~150 小时，优选进行 3 分钟~120 小时，更优选进行 30 分钟-100 小时。

在上述 (iii) 的 (1) 或 (2) 的制备方法中，水性介质中生成、累积的二肽的回收，可以通过使用活性炭、离子交换树脂等的常规的分离和纯化方法，或通过有机溶剂抽提、结晶、薄层层析、高效液相层析等进行。

下面展示了本发明的实施例，但是本发明并不受这些实施例的限制。

实施例 1

albC 基因以及其类似基因的获得

根据诺尔斯氏链霉菌的 albC 基因的碱基序列 [Chemistry & Biol., 9, 1355 (2002)], 用以下的方法获得来自诺尔斯氏链霉菌和白诺氏链霉菌的 albC 基因及其类似基因。

首先，诺尔斯氏链霉菌 IF015452 株和白诺氏链霉菌 IF014147 分别接种到添加了 1% 的甘氨酸的 KM73 培养基 [2g/l 酵母提取物 (Difco 公司制)、10g/l 可溶性淀粉 (和光纯药工业公司制造)、KP 培养基 [15g/L 葡萄糖、10g/l 的甘油、10g/l 多蛋白胨 (日本制药株式会社制)、10g/l 肉膏 (极东制药工业株式会社制)、4g/l 碳酸钙] 中，在 28℃ 下振摇过夜。并且，诺尔斯氏链霉菌 IF015452 株和白诺氏链霉菌 IF014147 株是从独立行政法人 制品评价技术基地机构 生物资源部门 [National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center (BRC)] (〒292-0818, 千叶县木更津市和佐 (かずさ) 镰足 2-5-8) 转让获得。

培养后，按 Genetic Manipulation of Streptomyces: a

Laboratory Manual: John Inners Foundation 中记载的方法从该微生物中分离纯化该微生物的染色体 DNA。

基于 *albC* 基因的碱基序列, 用 Perceptive Biosystems 公司制造的 8905 型 DNA 合成仪, 合成具有序列号 5 和 6 表示的碱基序列的 DNA (以下分别称为引物 A, 引物 B)。引物 A 为添加了含诺尔斯氏链霉菌的染色体 DNA 的 *albC* 基因的起始密码子区域的 5' 末端上含有 *NcoI* 识别序列的碱基序列。引物 B 为添加了与含 *albC* 基因的终止密码子的序列相互补的碱基序列的 5' 末端上含有 *BglIII* 识别序列的碱基序列。

使用上述引物 A 和引物 B 作为引物组, 以诺尔斯氏链霉菌或白诺氏链霉菌的染色体 DNA 作为模板, 进行 PCR。PCR 通过以下方式进行: 使用 50 μ l 反应液, 其中含 0.1 μ g 染色体 DNA, 引物各 0.5 μ mol/l, 2.5 units 的 ExTaq DNA 聚合酶(宝生物公司制), 5 μ l 用于 ExTaq DNA 聚合酶的 $\times 10$ 缓冲液(宝生物公司制), dNTP (dATP dGTP dCTP 和 dTTP) 各 200 μ mol/l, 5 μ l 二甲基亚砷, 重复进行 30 次 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 55 $^{\circ}$ C 30 秒, 72 $^{\circ}$ C 1 分钟的步骤。

将 1/10 的量的该反应液进行琼脂糖凝胶电泳, 确认扩增约 0.7kb 的 DNA 片段后, 添加与剩余的反应液等量的 TE [10mmol/l Tris-HCl (pH8.0)、1mmol/l EDTA] 饱和苯酚/氯仿(1vol/vol), 混合。离心分离该混合液后, 在所得上层中加入 2 倍体积的冷乙醇, 混合, 于 -80 $^{\circ}$ C 放置 30 分钟。将离心分离该溶液获得的 DNA 沉淀后, 分别溶解于 20 μ l 的 TE 中。

分别使用该溶解液 5 μ l, 用限制酶 *NcoI* 和 *BglIII* 切断扩增后的 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段后, 使用基因纯化 II 试剂盒 (GENECLEAN II kit BI0101 公司制), 分别回收 700bp 的 DNA 片段。

用限制性酶 *NcoI* 和 *BglIII* 切断 0.2 μ g 的含噬菌体 T5 启动子的表达载体 pQE60 (QIAGEN 公司制) 后, 通过琼脂糖凝胶电泳分离 DNA 片段, 通过与上述同样的方法回收 3.4kb 的 DNA 片段。

将由上述得到的来自各放线菌的 0.7kb 的片段和来自 pQE60 的 3.4kb 的 DNA 片段使用连接试剂盒(宝生物公司制), 在 16 $^{\circ}$ C 下反应

16 小时进行连接。

使用该反应液，通过使用钙离子法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA69, 2110 (1972)] 转化大肠杆菌 NM522 株 (Stratagene 公司制)，将该转化体涂布在含有 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基 (10g/1 细菌胰蛋白胨 (Difco 公司制)、5g/1 酵母提取物 (Difco 公司制)、5g/1 氯化钠、琼脂 20g/1] 后，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养过夜。

通过公知的方法从生长繁殖的转化体的克隆中提取质粒，使用限制性内切酶，进行结构分析，确认得到了在噬菌体 T5 启动子下游连接了来自诺尔斯氏链霉菌的 DNA 的表达载体 pAL-nou，和连接了来自白诺氏链霉菌的 DNA 的表达载体 pAL-a1b (图 1)。

使用碱基序列测定装置 373A-DAN 测序仪分别对插入到质粒中的来自放线菌的 DNA 部分的碱基序列进行测定，确认在 pAL-a1b 中具有编码序列号 1 所示的氨基酸序列的蛋白质的 DNA，即含有具有序列号 3 所示碱基序列的 DNA；在 pAL-nou 中具有编码序列号 2 所示的氨基酸序列的蛋白质的 DNA，即含有具有序列号 4 所示的碱基序列的 DNA。

实施例 2

以菌体作为酶源制备二肽

将带有实施例 1 中得到的带有 pAL-nou 或 pAL-a1b 的大肠杆菌 NM522 (大肠杆菌 NM522/pAL-nou 株或大肠杆菌 NM522/pAL-a1b 株) 以及不带有质粒的 NM522 株接种到装有含 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 氨苄青霉素的 10ml LB 培养基 (10g/1 细菌胰蛋白胨 (Difco 公司制)、5g/1 酵母提取物 (Difco 公司制)、5g/1 氯化钠] 的试管中 (不带有质粒株的情况下，不添加氨苄青霉素，以下相同) 后，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 17 小时。将 0.5ml 该培养液接种到装有 50ml LB 培养基的 250 ml 容量的三角烧瓶中，在 30 $^{\circ}\text{C}$ 下振荡培养 1 小时后，添加异丙基 β -D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 至终浓度为 1mmol/l，再继续培养 4 小时。离心分离该培养液，得到湿菌体。

制备含有终浓度 100mg/ml 的该湿菌体、3.0ml 的 60mmol/l 的磷酸钾缓冲液 (pH7.2)，10mmol/l 的氯化镁，10mmol/l 的 ATP，1g/L

的 L-亮氨酸, 1g/L 的 L-苯丙氨酸的反应液, 在 30℃ 下进行反应。反应 1 小时后取样, 添加乙腈至 20% (v/v) 后, 用 HPLC 分析反应生成物。

分离柱: ODS-HA 柱 (YMC 公司制)

洗脱液: 30% (v/v) 乙腈

流动速度: 0.6ml/min

检测: 紫外吸收 215nm

其结果, 确认大肠杆菌 NM522/pAL-nuo 株的反应液中累积了 36.7mg/ml 的 cyclo(L-Leu-L-Phe), 在大肠杆菌 NM522 株的反应液中几乎检测不出 cyclo(L-Leu-L-Phe)。相同的反应液以下述条件进行 HPLC 分析, 测定直链状的二肽 L-亮氨酰基-L-苯丙氨酸(L-Leu-L-Phe) 和 L-苯丙氨酰基-L-亮氨酸 (L-Phe-L-Leu)。

用 F-moc 法衍生化直链二肽之后, 进行 HPLC 分析。

分离柱: 野村化学公司制的 ODS-HG-5 柱

洗脱液: A 液-6 ml/L 醋酸、20% (v/v) 乙腈 (用三乙胺调节到 pH4.8)

洗脱液: B 液-6 ml/L 醋酸、70% (v/v) 乙腈 (用三乙胺调节到 pH4.8)

流动速度: 0.6ml/min

检测: 激发波长 254 nm, 荧光波长 630 nm

洗脱液混合比: 如表 1 所示

表 1

经过的时间 (分钟)	B%
0	20
5	60
35	90
36	20
40	20

其结果, 确认大肠杆菌 NM522/pAL-*nuo* 株的反应液中累积了 21.9mg/ml 的 L-Leu-L-Phe 和 12.0mg/ml L-Phe-L-Leu。在作为对照株的大肠杆菌 NM522 株的反应液中未检测出任何直链二肽。所以, 可以明确本发明得到的二肽合成酶具有合成直链状二肽的能力。

实施例 3

使用纯化酶制备二肽 (1)

同实施例 2 一样培养大肠杆菌 NM522/pAL-*nuo* 株。培养结束后, 通过离心得到湿菌体, 用 60mmol/l 的磷酸钾缓冲液 (pH7.2) 洗涤后, 重悬在含有 10mmol/l 咪唑的含 20mmol/l 的磷酸钾缓冲液中。将该混悬液在 4℃ 下超声波处理, 得到菌体破碎液。将该菌体破碎液 (10ml, 含 0.863 mg 蛋白质) 流过 Amersham 公司制的 His-tag 纯化柱, 通过流过柱子 15ml 含有 10mmol/l 咪唑的含 20mmol/l 的磷酸钾缓冲液进行洗涤, 在柱内进行附有 His-tag 的 albC 蛋白质的纯化。然后, 将该附有 His-tag 的 albC 蛋白质保持的柱子, 用 2ml 与实施例 2 相同组成的反应液 (反应液组成: 60mmol/l 的磷酸 L-钾缓冲液 (pH7.2)、10mmol/l 的氯化镁, 10mmol/l 的 ATP, 1g/L 的 L-亮氨酸, 1g/L 的 L-苯丙氨酸组成的反应液) 流过柱子, 以在柱子内保持底物的状态, 在 30℃ 下孵育, 用 2ml 相同组成的反应液洗脱柱内的反应液, 通过与实施例 2 相同的方法定量反应液中的环二肽和二肽。

其结果, 可知生成了 cyclo(L-Leu-L-Phe) 6.8mg/L、L-Leu-L-Phe 28.7mg/L 和 L-Phe-L-Leu 18.5mg/L。用不含 ATP 的反应液进行同样温育时, 未检测出环二肽、二肽。

实施例 4

用纯化酶制备二肽 (2)

除了用其它氨基酸替换底物氨基酸之外, 用与实施例 3 相同的方法进行酶反应, 分析生成物。反应液除了将底物氨基酸换成 1g/L 的 L-丙氨酸、L-亮氨酸或 L-苯丙氨酸之外, 使用与实施例 2 相同组成的溶液。

其结果, 可知在反应开始 24 小时后, 分别生成了 9.41mg/L 的

L-Ala-L-Ala、7.85mg/L 的 L-Leu-L-Leu 或 5.20mg/L 的 L-Phe-L-Phe。

序列表 free-text

序列号 5-人工序列的说明: 合成 DNA

序列号 6-人工序列的说明: 合成 DNA

序列表

<110> 协和发酵工业株式会社

<120> 二肽的制备方法

<130> 1679

<150> JP2004-125486

<151> 2004-04-21

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 239

<212> PRT

<213> 诺尔斯氏链霉菌 IFO 15452 (*Streptomyces noursei* IFO15452)

<400> 1

Met Leu Ala Gly Leu Val Pro Ala Pro Asp His Gly Met Arg Glu Glu
1 5 10 15

Ile Leu Gly Asp Arg Ser Arg Leu Ile Arg Gln Arg Gly Glu His Ala
20 25 30

Leu Ile Gly Ile Ser Ala Gly Asn Ser Tyr Phe Ser Gln Lys Asn Thr
35 40 45

Val Met Leu Leu Gln Trp Ala Gly Gln Arg Phe Glu Arg Thr Asp Val
50 55 60

Val Tyr Val Asp Thr His Ile Asp Glu Met Leu Ile Ala Asp Gly Arg
65 70 75 80

Ser Ala Gln Glu Ala Glu Arg Ser Val Lys Arg Thr Leu Lys Asp Leu
85 90 95

Arg Arg Arg Leu Arg Arg Ser Leu Glu Ser Val Gly Asp His Ala Glu
100 105 110

Arg Phe Arg Val Arg Ser Leu Ser Glu Leu Gln Glu Thr Pro Glu Tyr
115 120 125

Arg Ala Val Arg Glu Arg Thr Asp Arg Ala Phe Glu Glu Asp Ala Glu
130 135 140

Phe Ala Thr Ala Cys Glu Asp Met Val Arg Ala Val Val Met Asn Arg
145 150 155 160

Pro Gly Asp Gly Val Gly Ile Ser Ala Glu His Leu Arg Ala Gly Leu
165 170 175

Asn Tyr Val Leu Ala Glu Ala Pro Leu Phe Ala Asp Ser Pro Gly Val
180 185 190

Phe Ser Val Pro Ser Ser Val Leu Cys Tyr His Ile Asp Thr Pro Ile
195 200 205

Thr Ala Phe Leu Ser Arg Arg Glu Thr Gly Phe Arg Ala Ala Glu Gly
210 215 220

Gln Ala Tyr Val Val Val Arg Pro Gln Glu Leu Ala Asp Ala Ala
225 230 235

<210> 2

<211> 239

<212> PRT

<213> Streptomyces alborus IF015452

<400> 2

Met Leu Ala Gly Leu Val Pro Ala Leu Asp His Ser Met Arg Glu Glu
1 5 10 15

Ile Leu Gly Asn Arg Gly Arg Lys Ile Arg Gln Arg Gly Glu His Ala
20 25 30

Leu Ile Gly Ile Ser Ala Gly Asn Ser Tyr Phe Ser Gln Lys Asn Val
35 40 45

Thr Met Leu Leu Gln Trp Ala Gly Gln His Phe Glu Arg Thr Asp Val
50 55 60

Val Tyr Val Asp Thr His Ile Asp Asp Met Leu Met Ala Asp Gly Arg
65 70 75 80

Ser Ala Gln Glu Ala Glu Lys Ser Val Lys Arg Thr Leu Lys Asp Leu
85 90 95

Arg Arg Arg Leu Arg Arg Ser Leu Glu Ser Val Gly Asp His Ser Glu
100 105 110

Arg Phe Arg Val Arg Ser Leu Ser Glu Ile Gln Glu Thr Pro Glu Tyr
115 120 125

Arg Ala Ala Arg Glu Ser Thr Asp Arg Ala Phe Arg Glu Asp Gly Glu
130 135 140

Phe Ala Thr Val Cys Glu Glu Met Val Arg Ala Val Val Met Asn Arg
145 150 155 160

Pro Gly Asp Gly Val Asp Ile Ser Glu Glu His Leu Arg Ala Gly Leu
165 170 175

Asn Tyr Val Leu Ala Glu Ala Pro Leu Phe Ala Asp Ser Pro Gly Val
180 185 190

Phe Ser Val Pro Ser Ser Val Leu Cys Tyr His Ile Pro Thr Pro Val
195 200 205

Ser Thr Phe Leu Ala His Arg Glu Thr Gly Phe Gln Ala Ala Gln Gly
210 215 220

Gln Ala Tyr Val Val Val Arg Pro Gln Glu Leu Ala Asp Ala Ala
225 230 235

<210> 3

<211> 717

<212> DNA

<213> Streptomyces noursei IF015452

<400> 3

atg ctt gca ggc tta gtt ccc gcg ccg gac cac gga atg cgg gaa gaa 48
Met Leu Ala Gly Leu Val Pro Ala Pro Asp His Gly Met Arg Glu Glu
1 5 10 15

ata ctt ggc gac cgc agc cga ttg atc cgg caa cgc ggt gag cac gcc 96
Ile Leu Gly Asp Arg Ser Arg Leu Ile Arg Gln Arg Gly Glu His Ala
20 25 30

ctc atc gga atc agt gcg ggc aac agt tat ttc agc cag aag aac acc	144
Leu Ile Gly Ile Ser Ala Gly Asn Ser Tyr Phe Ser Gln Lys Asn Thr	
35 40 45	
gtc atg ctg ctg caa tgg gcc ggg cag cgt ttc gag cgc acc gat gtc	192
Val Met Leu Leu Gln Trp Ala Gly Gln Arg Phe Glu Arg Thr Asp Val	
50 55 60	
gtc tat gtc gac acc cac atc gac gag atg ctg atc gcc gac ggc cgc	240
Val Tyr Val Asp Thr His Ile Asp Glu Met Leu Ile Ala Asp Gly Arg	
65 70 75 80	
agc gcg cag gag gcc gag cgg tcg gtc aaa cgc acg ctc aag gat ctg	288
Ser Ala Gln Glu Ala Glu Arg Ser Val Lys Arg Thr Leu Lys Asp Leu	
85 90 95	
cgg cgc aga ctc cgg cgc tcg ctg gag agc gtg ggc gac cac gcc gag	336
Arg Arg Arg Leu Arg Arg Ser Leu Glu Ser Val Gly Asp His Ala Glu	
100 105 110	
cgg ttc cgt gtc cgg tcc ctg tcc gag ctc cag gag acc cct gag tac	384
Arg Phe Arg Val Arg Ser Leu Ser Glu Leu Gln Glu Thr Pro Glu Tyr	
115 120 125	
cgg gcc gta cgc gag cgc acc gac cgg gcc ttc gag gag gac gcc gaa	432
Arg Ala Val Arg Glu Arg Thr Asp Arg Ala Phe Glu Glu Asp Ala Glu	
130 135 140	
ttc gcc acc gcc tgc gag gac atg gtg cgg gcc gtg gtg atg aac cgg	480
Phe Ala Thr Ala Cys Glu Asp Met Val Arg Ala Val Val Met Asn Arg	
145 150 155 160	
ccc ggt gac ggc gtc ggc atc tcc gcg gaa cac ctg cgg gcc ggt ctg	528
Pro Gly Asp Gly Val Gly Ile Ser Ala Glu His Leu Arg Ala Gly Leu	
165 170 175	
aac tac gtg ctg gcc gag gcc ccg ctc ttc gcg gac tcg ccc gga gtc	576
Asn Tyr Val Leu Ala Glu Ala Pro Leu Phe Ala Asp Ser Pro Gly Val	
180 185 190	
ttc tcc gtc ccc tcc tcg gtg ctc tgc tac cac atc gac acc ccg atc	624
Phe Ser Val Pro Ser Ser Val Leu Cys Tyr His Ile Asp Thr Pro Ile	
195 200 205	

acg gcg ttc ctg tcc cgg cgc gag acc ggt ttc cgg gcg gcc gag gga 672
 Thr Ala Phe Leu Ser Arg Arg Glu Thr Gly Phe Arg Ala Ala Glu Gly
 210 215 220

cag gcg tac gtc gtc gtc agg ccc cag gag ctg gcc gac gcg gcc 717
 Gln Ala Tyr Val Val Val Arg Pro Gln Glu Leu Ala Asp Ala Ala
 225 230 235

<210> 4

<211> 717

<212> DNA

<213> Streptomyces alborus IF015452

<400> 4

atg cttgca ggc tta gtt ccc gcg ctg gac cac agc atg cgg gaa gaa 48
 Met Leu Ala Gly Leu Val Pro Ala Leu Asp His Ser Met Arg Glu Glu
 1 5 10 15

ata ctt ggc aat cgc ggc cga aag atc cgg caa cgc ggt gag cac gct 96
 Ile Leu Gly Asn Arg Gly Arg Lys Ile Arg Gln Arg Gly Glu His Ala
 20 25 30

ctc att gga atc agt gcg ggc aac agt tat ttc agc cag aag aac gtc 144
 Leu Ile Gly Ile Ser Ala Gly Asn Ser Tyr Phe Ser Gln Lys Asn Val
 35 40 45

acc atg ctg ctg caa tgg gcc ggg cag cat ttc gag cgc acg gat gtc 192
 Thr Met Leu Leu Gln Trp Ala Gly Gln His Phe Glu Arg Thr Asp Val
 50 55 60

gtc tac gtg gac acg cac atc gac gac atg ctg atg gcg gac ggc cgc 240
 Val Tyr Val Asp Thr His Ile Asp Asp Met Leu Met Ala Asp Gly Arg
 65 70 75 80

agc gcg cag gaa gcc gag aag tcg gtc aag cgc acg ctc aag gat ctg 288
 Ser Ala Gln Glu Ala Glu Lys Ser Val Lys Arg Thr Leu Lys Asp Leu
 85 90 95

cgg cgc agg ctg cgg cgc tcg ttg gaa agc gtg ggc gac cac agc gag 336
 Arg Arg Arg Leu Arg Arg Ser Leu Glu Ser Val Gly Asp His Ser Glu
 100 105 110

cgg ttc cgc gtc cgg tcc ctg tcc gag atc cag gag acc cct gag tac 384
 Arg Phe Arg Val Arg Ser Leu Ser Glu Ile Gln Glu Thr Pro Glu Tyr
 115 120 125

cgg gcc gca cgc gag tcc acc gac cgg gcc ttc cgc gag gac ggc gag 432
 Arg Ala Ala Arg Glu Ser Thr Asp Arg Ala Phe Arg Glu Asp Gly Glu
 130 135 140

ttc gcc acc gtc tgc gag gag atg gtg cgc gcc gtg gtg atg aac cgg 480
 Phe Ala Thr Val Cys Glu Glu Met Val Arg Ala Val Val Met Asn Arg
 145 150 155 160

ccc ggt gac ggc gtc gac atc tcg gag gaa cac ctg cgg gcc ggt ctg 528
 Pro Gly Asp Gly Val Asp Ile Ser Glu Glu His Leu Arg Ala Gly Leu
 165 170 175

aac tac gtg ctc gcc gag gcc ccg ctc ttc gcg gac tcg ccc ggc gtg 576
 Asn Tyr Val Leu Ala Glu Ala Pro Leu Phe Ala Asp Ser Pro Gly Val
 180 185 190

ttc tcc gtc ccc tcg tcg gtg ctc tgc tac cac atc ccc acc ccg gta 624
 Phe Ser Val Pro Ser Ser Val Leu Cys Tyr His Ile Pro Thr Pro Val
 195 200 205

tcg acg ttc ctg gcc cat cgc gag acc ggt ttc cag gcg gct cag ggt 672
 Ser Thr Phe Leu Ala His Arg Glu Thr Gly Phe Gln Ala Ala Gln Gly
 210 215 220

cag gca tac gtc gtc gtc agg ccg cag gag ctg gcc gac gcg gcc 717
 Gln Ala Tyr Val Val Val Arg Pro Gln Glu Leu Ala Asp Ala Ala
 225 230 235

<210> 5

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述: 合成 DNA

<400> 5

agagccatgg gacttgcagg cttagttccc gc

32

<210> 6

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>人工序列的描述: 合成 DNA

agagatatct ggccgcgtcg gccagctcc

29

图1

