

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4447467号
(P4447467)

(45) 発行日 平成22年4月7日 (2010.4.7)

(24) 登録日 平成22年1月29日 (2010.1.29)

(51) Int. Cl.

F I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C 1 2 N 1/21 (2006.01)

C 1 2 N 1/21

C 1 2 N 9/00 (2006.01)

C 1 2 N 9/00

C 1 2 P 21/02 (2006.01)

C 1 2 P 21/02

B

C 1 2 R 1/07 (2006.01)

C 1 2 P 21/02

C

請求項の数 10 (全 34 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-562956 (P2004-562956)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月26日 (2003.12.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2003/016936
 (87) 国際公開番号 W02004/058960
 (87) 国際公開日 平成16年7月15日 (2004.7.15)
 審査請求日 平成16年12月9日 (2004.12.9)
 (31) 優先権主張番号 特願2002-376054 (P2002-376054)
 (32) 優先日 平成14年12月26日 (2002.12.26)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2003-420887 (P2003-420887)
 (32) 優先日 平成15年12月18日 (2003.12.18)
 (33) 優先権主張国 日本国 (JP)

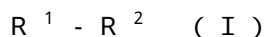
(73) 特許権者 308032666
 協和発酵バイオ株式会社
 東京都千代田区大手町一丁目6番1号
 (72) 発明者 橋本 信一
 山口県防府市協和町1番1号 協和発酵工業株式会社 生産技術研究所
 (72) 発明者 田畑 和彦
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵工業株式会社 東京研究所内
 (72) 発明者 久保田 文
 山口県防府市協和町1番1号 協和発酵工業株式会社 生産技術研究所
 (72) 発明者 池田 創
 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和発酵工業株式会社 東京研究所内
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ジペプチドの製造法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の [1] ~ [4] のいずれかに記載の蛋白質、1 種以上のアミノ酸、および A T P を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式 (I)



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時に L - アラニンを表すことはない) で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法。

[1] 配列番号 1 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

[2] 配列番号 1 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ式 (I)

で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[3] 配列番号 1 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 8 5 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ式 (I) で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[4] 配列番号 1 7 で表されるアミノ酸配列と 8 0 % 以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ式 (I) で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質

【請求項 2】

以下の [1] ~ [4] のいずれかに記載の D N A を含有する組換え体 D N A を有する形質転換体の培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、1 種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式 (I)

10

20

$R^1 - R^2$ (I)

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法。

[1] 請求項1記載の蛋白質をコードするDNA

[2] 配列番号9~16および36のいずれかで表される塩基配列を有するDNA

[3] 配列番号9~16および36のいずれかで表される塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ式(I)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA

[4] 配列番号18で表される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAであり、かつ式(I)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA

10

【請求項3】

以下の[1]~[4]から選ばれる培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、1種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式(I)

$R^1 - R^2$ (I)

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法。

[1] 配列番号1~8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物

20

[2] 配列番号1~8のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ式(I)

で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物

[3] 配列番号1~8のいずれかで表されるアミノ酸配列と85%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物

[4] 配列番号17で表されるアミノ酸配列と80%以上の同一性を有するアミノ酸配列を有し、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物

30

【請求項4】

微生物が、バチルス属に属する微生物である請求項3記載の製造法。

【請求項5】

バチルス属に属する微生物が、バシリシンを生産する能力を有するバチルス属に属する微生物である請求項4記載の製造法。

【請求項6】

バシリシンを生産する能力を有するバチルス属に属する微生物が、バチルス・サチリス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・コアギュランス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・メガテリウムおよびバチルス・プミルスからなる群より選ばれる種に属する微生物である請求項5記載の製造法。

40

【請求項7】

形質転換体が、微生物を宿主として得られる形質転換体である請求項2記載の製造法。

【請求項8】

微生物が、エシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物である請求項7記載の製造法。

【請求項9】

培養物の処理物が、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品である

50

ことを特徴とする、請求項 2 ~ 8 のいずれかに記載の製造法。

【請求項 10】

ジペプチドが式 (I I)



(式中、 R^3 および R^4 は同一または異なって、L - アラニン、L - グルタミン、L - グルタミン酸、グリシン、L - バリン、L - ロイシン、L - イソロイシン、L - プロリン、L - フェニルアラニン、L - トリプトファン、L - メチオニン、L - セリン、L - スレオニン、L - システイン、L - アスパラギン、L - チロシン、L - リジン、L - アルギニン、L - ヒスチジン、L - アスパラギン酸、L - - アミノ酪酸、- アラニン、L - アザセリン、L - テアニン、L - 4 - ヒドロキシプロリン、L - 3 - ヒドロキシプロリン、L - オルニチン、L - シトルリンおよびL - 6 - ジアゾ-5-オキソノルロイシンから選ばれるアミノ酸を表すが、同時にL - アラニンを表すことはない) で表されるジペプチドである請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、ジペプチド合成活性を有する蛋白質およびジペプチド合成用蛋白質、ジペプチド合成活性を有する蛋白質の製造法、ジペプチド合成活性を有する蛋白質またはジペプチド合成用蛋白質を用いたジペプチドの製造法、ジペプチド合成活性を有する蛋白質またはジペプチド合成用蛋白質を生産する微生物または形質転換体、および該微生物または形質転換体を用いたジペプチドの製造法に関する。

【背景技術】

ペプチドの大量合成法については、化学合成法(液相法、固相法)、酵素的合成法およびDNA組換え法を用いた生物学的合成法が知られている。現在、50残基以上の長鎖のペプチドに関しては酵素的合成法あるいは生物学的合成法が用いられ、ジペプチドに関しては化学合成法と酵素的合成法が主に用いられている。

化学合成法によるジペプチドの合成では、官能基の保護・脱保護などの操作が必要であり、またラセミ体も合成されることから、化学合成法は経済的、効率的な方法とはいえない。また、化学合成法は大量の有機溶媒等を使うため環境衛生上も好ましい方法ではない。

酵素法によるジペプチドの合成に関しては、タンパク質分解酵素(プロテアーゼ)の逆反応を利用した方法[*J. Biol. Chem.*, 119, 707 - 720 (1937) 参照]、耐熱性アミノアシル t - RNA 合成酵素を利用する方法[特開昭58 - 146539号公報、特開昭58 - 209991号公報、特開昭58 - 209992号公報および特開昭59 - 106298号公報参照]、非リボゾームペプチドシンセターゼ(以下、NRPSと称す)を利用する方法[*Chem. Biol.*, 7, 373 - 384 (2000)、*FEB S Lett.*, 498, 42 - 45 (2001)、米国特許第5795738号および米国特許第5652116号参照]が知られている。

しかし、タンパク質分解酵素の逆反応を利用した方法では、基質となるアミノ酸の官能基の保護・脱保護が必要であり、ペプチド形成反応の効率化およびペプチド分解反応の阻止が困難といった問題点がある。耐熱性アミノアシル t - RNA 合成酵素を利用する方法には、酵素の発現、目的産物以外の副生反応の阻止が困難という問題点がある。NRPSを利用する方法に関しては、酵素分子が巨大なためにDNA組換え法を用いて該酵素を発現することが困難であること、補酵素である4' - ホスフォパンテテイン(4' - phosphopantetheine)の供給が必要であり、効率的な製造法とはいえない。

一方、酵素分子量がNRPSより小さく、補酵素である4' - phosphopantetheineを必要としない - グルタミルシステインシンセターゼ(- glutamylcysteine synthetase)、グルタチオンシンセターゼ(glutathione synthetase)、D - アラニル - D - アラニン(D - Ala - D - Ala)リガーゼ(D - Ala - D - Ala ligase)、ポリ - - グルタミン酸シンセターゼ(poly - - glutamate synthetase)等の

一群のペプチドシンセターゼも知られている。これらの酵素の殆どはD - アミノ酸を基質に用いる、または 位のカルボキシル基でのペプチド結合の形成を触媒する等の特徴を有するため、L - アミノ酸の 位カルボキシル基でペプチド結合するジペプチドの合成に用いることはできない。

L - アミノ酸の 位カルボキシル基でのペプチド結合形成活性によるジペプチド生成が知られているのはバチルス属に属する微生物由来のジペプチド抗生物質であるバシリシン合成酵素のみである。バシリシン合成酵素は、バシリシン (L - アラニル - L - アンチカプシン、L - A l a - L - a n t i c a p s i n) 及びL - アラニル - L - アラニン (L - A l a - L - A l a) を合成する活性を有することは知られているが、その他のジペプチドの合成活性については知られていない [J . I n d . M i c r o b i o l . , 2 , 2 0 1 - 2 0 8 (1 9 8 7) および E n z y m e . M i c r o b i a l . T e c h n o l . , 2 9 , 4 0 0 - 4 0 6 (2 0 0 1) 参照]。

一方、全ゲノム情報の解明されたバチルス・サチリス (B a c i l l u s s u b t i l i s) 1 6 8 株 [N a t u r e , 3 9 0 , 2 4 9 - 2 5 6 (1 9 9 7)] におけるバシリシン合成酵素遺伝子群に関しては、y w f A ~ F の O R F を含むバシリシンオペロンを増幅するとバシリシンの生産性が増加することが知られている [国際公開特許第 0 0 - 0 3 0 0 9 号パンフレット参照]。しかしこれらの O R F の中に 2 種以上のアミノ酸をペプチド結合で連結する活性を有する蛋白質をコードする O R F が含まれているか、含まれているとすれば、どの O R F が該蛋白質をコードするかについては知られていない。

【発明の開示】

本発明の目的は、ペプチドシンセターゼ等による酵素的合成法が知られていなかった L - アラニル - L - アラニン (L - A l a - L - A l a) 以外のジペプチドの合成活性を有する蛋白質および該ジペプチド合成用蛋白質、該ジペプチドの合成活性を有する蛋白質をコードする DNA、該 DNA を含有する組換え体 DNA、該組換え体 DNA を保有する形質転換体、該ジペプチドの合成活性を有する蛋白質の製造法、該ジペプチドの合成活性を有する蛋白質または該ジペプチド合成用蛋白質を用いた該ジペプチドの酵素的合成法、該ジペプチドの合成活性を有する蛋白質または該ジペプチド合成用蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物等を酵素源に用いたジペプチドの製造法を提供することにある。

本発明は、以下の (1) ~ (2 1) に関する。

(1) 以下の [1] ~ [4] のいずれかに記載の蛋白質 (ただし、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質を除く)。

[1] 配列番号 2 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質

[2] 配列番号 1 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1 以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ式 (I)

$$R^1 - R^2 \quad (I)$$

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時に L - アラニンを表すことはない) で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[3] 配列番号 1 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列と 6 5 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ式 (I) で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質

[4] 配列番号 1 7 で表されるアミノ酸配列と 8 0 % 以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ式 (I) で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質

(2) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列を有する、式 (I)

$$R^1 - R^2 \quad (I)$$

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時に L - アラニンを表すことはない) で表されるジペプチドの合成用蛋白質。

(3) 以下の [1] ~ [4] のいずれかに記載の DNA (ただし、配列番号 9 で表される塩基配列からなる DNA を除く)。

[1] 上記 (1) の蛋白質をコードする DNA

[2] 配列番号 1 0 ~ 1 6 および 3 6 のいずれかで表される塩基配列を有する DNA

[3] 配列番号 9 ~ 1 6 および 3 6 のいずれかで表される塩基配列と相補的な塩基配列を

有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ式(Ⅰ)

$$R^1 - R^2 \quad (Ⅰ)$$

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA [4] 配列番号18で表される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAであり、かつ式(Ⅰ)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA

(4) 上記(3)のDNAを含有する組換え体DNA。

(5) 上記(4)の組換え体DNAを有する形質転換体。

(6) 形質転換体が、微生物を宿主として得られる形質転換体である上記(5)の形質転換体。

(7) 微生物が、エシェリヒア(Escherichia)属に属する微生物である上記(6)の形質転換体。

(8) 上記(5)~(7)のいずれか1項に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に上記(1)の蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取する上記(1)の蛋白質の製造法。

(9) 上記(1)の蛋白質を生産する能力を有する微生物を培地に培養し、培養物中に該蛋白質を生成、蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取する上記(1)の蛋白質の製造法。

(10) 微生物がバチルス(Bacillus)属に属する微生物である上記(9)の製造法。

(11) バチルス属に属する微生物が、バシリシンを生産する能力を有するバチルス属に属する微生物である上記(10)の製造法。

(12) バシリシンを生産する能力を有するバチルス属に属する微生物が、バチルス・サチリス(Bacillus subtilis)、バチルス・アミロリケファシエンス(Bacillus amyloliquefaciens)、バチルス・コアギュランス(Bacillus coagulans)、バチルス・リケニフォルミス(Bacillus licheniiformis)、バチルス・メガテリウム(Bacillus megaterium)およびバチルス・プミルス(Bacillus pumilus)からなる群より選ばれる種に属する微生物である上記(11)の製造法。

(13) 上記(1)の蛋白質または上記(2)のジペプチドの合成用蛋白質、1種以上のアミノ酸、およびATPを水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式(Ⅰ)

$$R^1 - R^2 \quad (Ⅰ)$$

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法。

(14) 以下の[1]~[3]から選ばれる培養物または該培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、1種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式(Ⅰ)

$$R^1 - R^2 \quad (Ⅰ)$$

(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法。

[1] 上記(5)~(7)のいずれか1項に記載の形質転換体の培養物または該培養物の処理物 [2] 上記(1)の蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物 [3] 上記(2)のジペプチドの合成用蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物または該培養物の処理物

(15) 上記(1)の蛋白質を生産する能力を有する微生物がバチルス属に属する微生物である上記(14)の製造法。

(16) バチルス属に属する微生物が、バシリシンを生産する能力を有するバチルス属に属する微生物である上記(15)の製造法。

10

20

30

40

50

(17) バシリシンを生産する能力を有するバチルス属に属する微生物が、バチルス・サチリス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・コアギュランス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・メガテリウムおよびバチルス・プミルスからなる群より選ばれる種に属する微生物である上記(16)の製造法。

(18) 上記(2)のジペプチドの合成用蛋白質を生産する能力を有する微生物が配列番号9で表される塩基配列を有するDNAを含む組換え体DNAを含有する微生物、またはバチルス・サチリスに属する微生物である上記(14)の製造法。

(19) 配列番号9で表される塩基配列を有するDNAを含む組換え体DNAを含有する微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である上記(18)の製造法。

(20) 培養物の処理物が、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品であることを特徴とする、上記(14)～(19)の製造法。

(21) ジペプチドが式(II)

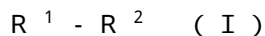


(式中、 R^3 および R^4 は同一または異なって、L-アラニン、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-プロリン、L-フェニルアラニン、L-トリプトファン、L-メチオニン、L-セリン、L-スレオニン、L-システイン、L-アスパラギン、L-チロシン、L-リジン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-アスパラギン酸、L- - アミノ酪酸、 - アラニン、L-アザセリン、L-テアニン、L-4-ヒドロキシプロリン、L-3-ヒドロキシプロリン、L-オルニチン、L-シトルリンおよびL-6-ジアゾ-5-オキソノルロイシンから選ばれるアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチドである上記(13)～(20)の製造法。

本発明の蛋白質としては、

[1] 配列番号2～8のいずれかで表されるアミノ酸配列を有する蛋白質、

[2] 配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列において、1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加したアミノ酸配列からなり、かつ式(I)



(式中、 R^1 および R^2 は、同一または異なってアミノ酸を表すが、同時にL-アラニンを表すことはない)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質、

[3] 配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列と65%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質、

[4] 配列番号17で表されるアミノ酸配列と80%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有し、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質、
をあげることができる(ただし、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質を除く)。

また、本発明の式(I)で表されるジペプチドの合成用蛋白質としては、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。

以下、上記本発明の蛋白質および式(I)で表されるジペプチドの合成用蛋白質を合わせて本発明の蛋白質と称する場合もある。

上記において、1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) (以下、モレキュラー・クローニング第2版と略す)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) (以下、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーと略す)、Nucleic Acids Research, 10

10

20

30

40

50

, 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)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて、例えば配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより、取得することができる。

欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、上記の部位特異的変異法等の周知の方法により欠失、置換または付加できる程度の数であり、1個から数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

10

配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたとは、同一配列中の任意の位置において、1または複数のアミノ酸が欠失、置換または付加されていてもよい。

アミノ酸の置換が可能なアミノ酸としては、例えば配列番号1～8で表されるアミノ酸配列を公知のアライメントソフトウェアを用いて比較したときに、すべてのアミノ酸配列において保存されていないアミノ酸をあげることができる。公知のアライメントソフトウェアとしては、例えば遺伝子解析ソフトウェアGenetyx(ソフトウェア開発株式会社)に含まれるアライメント解析ソフトをあげることができる。該解析ソフトの解析パラメータとしては、デフォルト値を用いることができる。

また、アミノ酸の欠失または付加が可能なアミノ酸の位置としては、例えば配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列のN末端側およびC末端側をあげることができる。

20

欠失、置換または付加は同時に生じてよく、置換または付加されるアミノ酸は天然型と非天然型とを問わない。天然型アミノ酸としては、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、L-システインなどがあげられる。

以下に、相互に置換可能なアミノ酸の例を示す。同一群に含まれるアミノ酸は相互に置換可能である。

30

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸、2,3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

40

G群：フェニルアラニン、チロシン

また、本発明の蛋白質が式(I)で表されるジペプチド合成活性を有するためには、配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号1で表されるアミノ酸配列との相同性が65%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有していることが望ましい。

アミノ酸配列や塩基配列の相同性は、Karlin and AltschulによるアルゴリズムBLAST[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 5873 (1993)]やFASTA[Methods Enzymol., 183, 63 (1990)]を用いて決定することができる。このアルゴリズムBLASTに基づいて、B

50

L A S T NやB L A S T Xとよばれるプログラムが開発されている[J . M o l . B i o l . , 2 1 5 , 4 0 3 (1 9 9 0)]。B L A S Tに基づいてB L A S T Nによって塩基配列を解析する場合には、パラメータは例えばS c o r e = 1 0 0、w o r d l e n g t h = 1 2とする。また、B L A S Tに基づいてB L A S T Xによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメータは例えばs c o r e = 5 0、w o r d l e n g t h = 3とする。B L A S TとG a p p e d B L A S Tプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である(h t t p : / / w w w . n c b i . n l m . n i h . g o v .)。

また、配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列、好ましくは配列番号1で表されるアミノ酸配列と65%以上、好ましくは75%以上、より好ましくは85%以上、さらに好ましくは90%以上、特に好ましくは95%以上、最も好ましくは98%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質もまた本発明の蛋白質である(ただし、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質を除く)。アミノ酸配列の相同性は、上記したようにB L A S TやF A S T Aを用いて決定することができる。

10

配列番号17で表されるアミノ酸配列は、配列番号1～7で表されるアミノ酸配列を有する蛋白質の間で保存されている領域であり、かつ各種微生物のA l a - A l aリガーゼ活性を有する蛋白質のコンセンサス配列に対応する領域である。

配列番号17で表されるアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質であり、かつ式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質もまた本発明の蛋白質である(ただし、配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質を除く)。

20

配列番号17で表されるアミノ酸配列と80%以上、好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有する蛋白質が、式(I)で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質であるためには、該蛋白質のアミノ酸配列と配列番号1～8のいずれかで表されるアミノ酸配列との相同性が、少なくとも80%以上、通常は90%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

アミノ酸配列の相同性は、上記したようにB L A S TやF A S T Aを用いて決定することができる。

本発明の蛋白質が、上記式(I)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質であることを確認する手段としては、例えばDNA組換え法を用いて本発明の蛋白質を発現する形質転換体を作製し、該形質転換体を用いて本発明の蛋白質を製造した後、本発明の蛋白質、1種以上のL-アミノ酸(ただし、L-アラニンは他のL-アミノ酸とともに用いる)、およびATPを水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中に上記式(I)で表されるジペプチドが生成、蓄積するか否かをH P L C等により分析する方法をあげることができる。

30

本発明のDNAとしては、

[5] 上記[1]～[4]記載の本発明の蛋白質をコードするDNA、

[6] 配列番号10～16および36のいずれかで表される塩基配列を有するDNA、

[7] 配列番号9～16および36のいずれかで表される塩基配列と相補的な塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ式(I)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA(ただし、配列番号9で表される塩基配列からなるDNAを除き、好ましくは配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAを除く)、

40

[8] 配列番号18で表される塩基配列と80%以上の相同性を有する塩基配列を有するDNAであり、かつ式(I)で表されるジペプチド合成活性を有する蛋白質をコードするDNA(ただし、配列番号9で表される塩基配列からなるDNAを除き、好ましくは配列番号1で表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするDNAを除く)、をあげることができる。

また、本発明の式(I)で表されるジペプチドの製造法に用いることができるDNAと

50

しては、上記〔５〕～〔８〕記載のＤＮＡおよび配列番号９で表される塩基配列からなるＤＮＡをあげることができる。

上記のストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なＤＮＡとは、配列番号９～１６および３６のいずれかで表される塩基配列と相補的な塩基配列を有するＤＮＡの一部、または全部をプローブとして、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法あるいはサザンブロットハイブリダイゼーション法等を用いることにより得られるＤＮＡを意味し、具体的には、コロニーあるいはブランク由来のＤＮＡを固定化したフィルターを用いて、 $0.7 \sim 1.0 \text{ mol/l}$ の塩化ナトリウム存在下、 65°C でハイブリダイゼーションを行った後、 $0.1 \sim 2$ 倍濃度のＳＳＣ溶液（１倍濃度のＳＳＣ溶液の組成は、 150 mmol/l 塩化ナトリウム、 15 mmol/l クエン酸ナトリウムよりなる）を用い、 65°C 条件下でフィルターを洗浄することにより同定できるＤＮＡをあげることができる。ハイブリダイゼーションは、モレキュラー・クローニング第２版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)等に記載されている方法に準じて行うことができる。ハイブリダイズ可能なＤＮＡとして具体的には、上記したＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡ等を用いて、上記パラメータに基づいて計算したときに、配列番号９～１６のいずれかで表される塩基配列と少なくとも７５％以上、好ましくは８５％以上、さらに好ましくは９０％以上、特に好ましくは９５％以上の相同性を有するＤＮＡをあげることができる。

配列番号９～１６および３６のいずれかで表される塩基配列を有するＤＮＡとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするＤＮＡが、式（Ⅰ）で表されるジペプチドの合成活性を有する蛋白質をコードするＤＮＡであることは、例えば上記したように、組換えＤＮＡ法を用いて該ＤＮＡにコードされる蛋白質を製造し、該蛋白質の活性を測定することにより確認することができる。

（ⅰ）本発明のＤＮＡ、および本発明の蛋白質またはジペプチドの製造法に用いられるＤＮＡの調製

本発明のＤＮＡ、および本発明の蛋白質またはジペプチドの製造法（以下、単に本発明の製造法ともいう）に用いられるＤＮＡは、例えば、配列番号９～１６および３６で表される塩基配列に基づき設計することができるプローブを用いた、バチルス属に属する微生物の染色体ＤＮＡライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション、または配列番号９～１６および３６で表される塩基配列に基づき設計することができるプライマーＤＮＡを用いた、バチルス属に属する微生物の染色体ＤＮＡを鋳型としたＰＣＲ〔ＰＣＲ Protocol, Academic Press (1990)〕により取得することができる。

また、各種の遺伝子配列データベースに対して配列番号１～８および１７のいずれかで表されるアミノ酸配列をコードするＤＮＡの塩基配列と７５％以上、好ましくは８５％以上、より好ましくは９０％以上、さらに好ましくは９５％以上、特に好ましくは９８％以上の相同性を有する配列を検索し、該検索によって得られた塩基配列に基づき、該塩基配列を有する生物の染色体ＤＮＡ、ｃＤＮＡライブラリー等から上記した方法により本発明のＤＮＡ、または本発明の製造法に用いられるＤＮＡを取得することもできる。

取得したＤＮＡをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断し、常法によりベクターに組み込み、得られた組換え体ＤＮＡを宿主細胞に導入した後、通常用いられる塩基配列解析方法、例えばジデオキシ法〔Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 74, 5463 (1977)〕あるいは３７３Ａ・ＤＮＡシーケンサー（パーキン・エルマー社製）等の塩基配列分析装置を用いて分析することにより、該ＤＮＡの塩基配列を決定することができる。

塩基配列を決定した結果、取得されたＤＮＡが部分長であった場合は、該部分長ＤＮＡをプローブに用いた、染色体ＤＮＡライブラリーに対するサザンハイブリダイゼーション法等により、全長ＤＮＡを取得することができる。

更に、決定されたDNAの塩基配列に基づいて、パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置等を用いて化学合成することにより目的とするDNAを調製することもできる。

上記のようにして取得されるDNAとして、例えば、配列番号9～16および36で表される塩基配列を有するDNAをあげることができる。

本発明のDNAおよび本発明の製造法に用いられるDNAを組み込むベクターとしては、pBlueScript II KS(+) (ストラタジーン社製)、pDIRECT [Nucleic Acids Res., 18, 6069 (1990)]、pCR-Script Amp SK(+) (ストラタジーン社製)、pT7Blue (ノバジェン社製)、pCRII (インビトロジェン社製) およびpCR-TRAP (ジーンハンター社製)などをあげることができる。

10

宿主細胞としては、エシェリヒア属に属する微生物などをあげることができる。エシェリヒア属に属する微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) XL1-Blue、エシェリヒア・コリXL2-Blue、エシェリヒア・コリDH1、エシェリヒア・コリMC1000、エシェリヒア・コリATCC12435、エシェリヒア・コリW1485、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリNo. 49、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリNY49、エシェリヒア・コリMP347、エシェリヒア・コリNM522、エシェリヒア・コリME8415等をあげることができる。

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

20

上記方法によって得られる本発明の製造法に用いられるDNAを保有する微生物としては、例えば配列番号1で表される配列を有するDNAを含有する組換え体DNAを保有する微生物であるエシェリヒア・コリNM522 / pPE43をあげることができる。

(ii) 本発明の蛋白質の製造法

本発明の蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー等に記載された方法等を用い、例えば以下の方法により、上記(i)の方法により取得した本発明のDNAおよび本発明の製造法に用いられるDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

30

本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNAをもとにして、必要に応じて、本発明の蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製する。また、該蛋白質をコードする部分の塩基配列を、宿主の発現に最適なコドンとなるように、塩基を置換することにより、該蛋白質の生産率を向上させることができる。

該DNA断片を適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換え体DNAを作製する。

該組換え体DNAを、該発現ベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、本発明の蛋白質を生産する形質転換体を得ることができる。

40

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、植物細胞等、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

発現ベクターとしては、上記宿主細胞において自立複製可能なものは染色体中への組込が可能で、本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNAを転写できる位置にプロモーターを含有しているものが用いられる。

細菌等の原核生物を宿主細胞として用いる場合は、本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNAを有する組換え体DNAは、原核生物中で自立複製可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNA、転写終結配列より構成された組換え体DNAであることが好ましい。プロモーターを制御する遺伝子が含まれていてもよい。

50

発現ベクターとしては、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（いずれもベリ
ンガー・マンハイム社製）、pHelix1（ロシュ・ダイアグノスティクス社製）、pK
K233-2（アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）、pSE280（インビト
ロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、p
ET-3（ノバジェン社製）、pKYP10（特開昭58-110600）、pKYP2
00 [Agric. Biol. Chem., 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Pro
c. Natl. Acad. Sci., USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK(+)
、pBluescript II KS(-)（ストラ
タジーン社製）、pTrs30 [エシェリヒア・コリJM109 / pTrs30 (FER
M BP-5407) より調製]、pTrs32 [エシェリヒア・コリJM109 / pT
rs32 (FERM BP-5408) より調製]、pPAC31 (WO98/1234
3)、pUC19 [Gene, 33, 103 (1985)]、pSTV28（宝酒造社製
）、pUC118（宝酒造社製）、pPA1（特開昭63-233798）等を例示する
ことができる。

プロモーターとしては、エシェリヒア・コリ等の宿主細胞中で機能するものであればい
かなるものでもよい。例えば、trpプロモーター（P_{trp}）、lacプロモーター（P_{lac}）、P_Lプロモーター、P_Rプロモーター、P_{SE}プロモーター等の、大腸菌や
ファージ等に由来するプロモーター、SPO1プロモーター、SPO2プロモーター、p
enPプロモーター等をあげることができる。またP_{trp}を2つ直列させたプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、let Iプロモーターのように人
為的に設計改変されたプロモーター等も用いることができる。

さらにバチルス属に属する微生物中で発現させるためのxy1Aプロモーター [App
l. Microbiol. Biotechnol., 35, 594-599 (1991)
] やコリネバクテリウム (Corynebacterium) 属に属する微生物中で発現
させるためのP54-6プロモーター [App l. Microbiol. Biotech
nol., 53, 674-679 (2000)] など用いることができる。

リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガノ (Shine-Dalgarno) 配列
と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いる
ことが好ましい。

本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNAを発現ベクターに結合させた
組換え体DNAにおいては、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下
に転写終結配列を配置することが好ましい。

このような組換え体DNAとしては、例えばpPE43をあげることができる。

原核生物としては、エシェリヒア属、セラチア (Serratia) 属、バチルス属、
ブレヴィバクテリウム (Brevibacterium) 属、コリネバクテリウム (Cory
nebacterium) 属、ミクロバクテリウム属 (Microbacterium
)、シュドモナス (Pseudomonas) 属、アグロバクテリウム (Agroba
cterium) 属、アリシクロバチルス属 (Alicyclobacillus)、ア
ナベナ (Anabena) 属、アナシスティス (Anacystis) 属、アスロバクテ
ー (Arthrobacter) 属、アゾトバクテリウム (Azotobacter) 属、ク
ロマチウム (Chromatium) 属、エルビニア (Erwinia) 属、メチロバク
テリウム (Methylobacterium) 属、フォルミディウム (Phormid
ium) 属、ロドバクテリウム (Rhodobacter) 属、ロドシュドモナス (Rho
dopseudomonas) 属、ロドスピリウム (Rhodospirillum) 属
、セネデスムス (Scenedesmus) 属、ストレプトマイセス (Streptom
yces) 属、シネコッカス (Synechococcus) 属、ザイモモナス (Zymom
onas) 属等に属する微生物、例えば、エシェリヒア・コリXL1-Blue、エシェ
リヒア・コリXL2-Blue、エシェリヒア・コリDH1、エシェリヒア・コリDH5
、エシェリヒア・コリMC1000、エシェリヒア・コリKY3276、エシェリヒア

・コリW1485、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリHB101、エ
 シェリヒア・コリNo. 49、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリNY
 49、エシェリヒア・コリMP347、エシェリヒア・コリNM522、バチルス・サチ
 リスATCC33712、バチルス・メガテリウム、バチルス・エスピー (Bacillus
sp.) FERM BP-6030、バチルス・アミロリケファスエンス、バチル
 ス・コアギュランス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・ブミルス、ブレビバクテ
 リウム・アンモニアゲネス (Brevibacterium ammoniagenes)
 、ブレビバクテリウム・イマリオフィルム (Brevibacterium immari
ophilum) ATCC14068、ブレビバクテリウム・サッカロリティカム (Br
evibacterium saccharolyticum) ATCC14066、ブレ 10
 ビバクテリウム・フラバム (Brevibacterium flavum) ATCC14
 067、ブレビバクテリウム・ラクトファーメンタム (Brevibacterium l
actofermentum) ATCC13869、コリネバクテリウム・グルタミカム
 (Corynebacterium glutamicum) ATCC13032、コリネ
 バクテリウム・グルタミカム ATCC14297、コリネバクテリウム・アセトアシドフ
 ィルム (Corynebacterium acetoacidophilum) ATCC
 13870、ミクロバクテリウム・アンモニアフィルム (Microbacterium
ammoniaophilum) ATCC15354、セラチア・フィカリア (Serra
tia ficaria)、セラチア・フォンチコラ (Serratia fonticol
a)、セラチア・リケファシエンス (Serratia liquefaciens)、セラ 20
 チア・マルセッセンス (Serratia marcescens)、シュードモナス・
 エスピー (Pseudomonas sp.) D-0110、アグロバクテリウム・ラジ
 オバクター (Agrobacterium radiobacter)、アグロバクテリウ
 ム・リゾジーンズ (Agrobacterium rhizogenes)、アグロバクテ
 リウム・ルビ (Agrobacterium rubi)、アナベナ・シリンドリカ (An
abaenacylindrica)、アナベナ・ドリオルム (Anabaena dol
iolum)、アナベナ・フロサクア (Anabaena flos-aquae)、ア
 ースロバクター・オーレッセンス (Arthrobacter aureescens)、ア
 ースロバクター・シトレウス (Arthrobacter citreus)、アースロバ
 クター・グロブフォルミス (Arthrobacter globiformis)、アース 30
 ロバクター・ヒドロカーボグルタミカス (Arthrobacter hydrocarb
oglutamicus)、アースロバクター・ミソレンス (Arthrobacter
mysorensis)、アースロバクター・ニコチアナ (Arthrobacter nic
otianae)、アースロバクター・パラフィネウス (Arthrobacter pa
raffineus)、アースロバクター・プロトフォルミエ (Arthrobacte
r protophormiae)、アースロバクター・ロセオパラフィナス (Arthr
obacter roseoparaffinus)、アースロバクター・スルフレウス (Arthr
obactersulfureus)、アースロバクター・ウレアファシエン
 ス (Arthrobacter ureafaciens)、クロマチウム・ブデリ (Ch
romatium buderii)、クロマチウム・テピダム (Chromatium te
pidum)、クロマチウム・ビノサム (Chromatium vinosum)、クロ 40
 マチウム・ワーミング (Chromatium warmingii)、クロマチウム・フ
 ルビアタティレ (Chromatium fluviatile)、エルビニア・ウレドバ
 ラ (Erwinia auredovora)、エルビニア・カロトバラ (Erwinia ac
arotovora)、エルビニア・アナス (Erwinia ananas)、エルビニ
 ア・ヘリコラ (Erwinia herbicola)、エルビニア・パンクタタ (Erw
iniapunctata)、エルビニア・テレウス (Erwinia terreus)
 、メチロバクテリウム・ロデシアナム (Methylobacterium rhodes
ianum)、メチロバクテリウム・エクソトルクエンス (Methylobacter
ium extorquens)、フォルミディウム・エスピー (Phormidium 50

sp.) ATCC 29409、ロドバクター・カプスラタス (Rhodobacter capsulatus)、ロドバクター・スフェロイデス (Rhodobactersphaeroides)、ロドシュードモナス・ブラステカ (Rhodopseudomonas blautica)、ロドシュードモナス・マリナ (Rhodopseudomonas marina)、ロドシュードモナス・パルストリス (Rhodopseudomonas palustris)、ロドスピリウム・リブラム (Rhodospirillum rubrum)、ロドスピリウム・サレキシゲンス (Rhodospirillum salicigenans)、ロドスピリウム・サリナラム (Rhodospirillum salinarum)、ストレプトマイセス・アンボファシエンス (Streptomyces ambofaciens)、ストレプトマイセス・オーレオファシエンス (Streptomyces aureofaciens)、ストレプトマイセス・アウレウス (Streptomyces aureus)、ストレプトマイセス・フンジシディカス (Streptomyces fungicidicus)、ストレプトマイセス・グリセオクロモゲナス (Streptomyces griseochromogenes)、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・リビダンス (Streptomyces lividans)、ストレプトマイセス・オリボグリセウス (Streptomyces olivogriseus)、ストレプトマイセス・ラメウス (Streptomyces rameus)、ストレプトマイセス・タナシエンシス (Streptomyces tanashiensis)、ストレプトマイセス・ビナセウス (Streptomyces vinaceus)、ザイモモナス・モビリス (Zymomonas mobilis) 等をあげることができる。

10

20

組換え体DNAの導入方法としては、上記宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 69, 2110 (1972)]、プロトプラスト法 (特開昭63-248394)、エレクトロポレーション法 [Nucleic Acids Res., 16, 6127 (1988)] 等をあげることができる。

酵母菌株を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、YEp13 (ATCC 37115)、YEp24 (ATCC 37051)、YCp50 (ATCC 37419)、pHS19、pHS15 等を用いることができる。

プロモーターとしては、酵母菌株中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、PHO5 プロモーター、PGK プロモーター、GAP プロモーター、ADH プロモーター、gal 1 プロモーター、gal 10 プロモーター、ヒートショックポリペプチドプロモーター、MF 1 プロモーター、CUP 1 プロモーター等のプロモーターをあげることができる。

30

宿主細胞としては、サッカロマイセス (Saccharomyces) 属、シゾサッカロマイセス (Schizosaccharomyces) 属、クルイベロマイセス (Kluyveromyces) 属、トリコスポロン (Trichosporon) 属、シワニオマイセス (Schwanniomyces) 属、ピチア (Pichia) 属、またはキャンディダ (Candida) 属等に属する酵母菌株をあげることができ、具体的には、サッカロマイセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae)、シゾサッカロマイセス・ボンベ (Schizosaccharomyces pombe)、クルイベロマイセス・ラクティス (Kluyveromyces lactis)、トリコスポロン・プルランス (Trichosporon pullulans)、シワニオマイセス・アルビウス (Schwanniomyces alluvius)、ピチア・パストリス (Pichiapastoris)、キャンディダ・ウティリス (Candida utilis) 等をあげることができる。

40

組換え体DNAの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Methods Enzymol., 194, 182 (1990)]、スフェロプラスト法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 81, 4889 (1984)]、酢酸リチウム法 [J. Bact

50

erio1. , 153 , 163 (1983)] 等をあげることができる。

動物細胞を宿主として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、p c D N A I、p c D M 8 (フナコシ社より市販)、p A G E 1 0 7 (特開平 3 - 2 2 9 7 9)、p A S 3 - 3 (特開平 2 - 2 2 7 0 7 5)、p C D M 8 [N a t u r e , 329 , 840 (1987)]、p c D N A I / A m p (インビトロジェン社製)、p R E P 4 (インビトロジェン社製)、p A G E 1 0 3 [J . B i o c h e m , 101 , 1307 (1987)]、p A G E 2 1 0、p A M o、p A M o A 等を用いることができる。

プロモーターとしては、動物細胞中で機能するものであればいずれも用いることができ、例えば、サイトメガロウイルス (C M V) の I E (i m m e d i a t e e a r l y) 遺伝子のプロモーター、S V 4 0 の初期プロモーターあるいはメタロチオネインのプロモーター、レトロウイルスのプロモーター、ヒートショックプロモーター、S R プロモーター等をあげることができる。また、ヒト C M V の I E 遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

10

宿主細胞としては、マウス・ミエローマ細胞、ラット・ミエローマ細胞、マウス・ハイブリドーマ細胞、ヒトの細胞であるナマルバ (N a m a l w a) 細胞またはナマルバ K J M - 1 細胞、ヒト胎児腎臓細胞、ヒト白血病細胞、アフリカミドリザル腎臓細胞、チャニーズ・ハムスターの細胞である C H O 細胞、H B T 5 6 3 7 (特開昭 6 3 - 2 9 9) 等をあげることができる。

マウス・ミエローマ細胞としては、S P 2 / 0、N S O 等、ラット・ミエローマ細胞としては Y B 2 / 0 等、ヒト胎児腎臓細胞としては H E K 2 9 3 (A T C C C R L - 1 5 7 3)、ヒト白血病細胞としては B A L L - 1 等、アフリカミドリザル腎臓細胞としては C O S - 1、C O S - 7 等をあげることができる。

20

組換え体 DNA の導入方法としては、動物細胞に DNA を導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [C y t o t e c h n o l o g y , 3 , 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (特開平 2 - 2 2 7 0 7 5)、リポフェクション法 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , 84 , 7413 (1987)]、V i r o l o g y , 52 , 456 (1973) に記載の方法等をあげることができる。

昆虫細胞を宿主として用いる場合には、例えば B a c u l o v i r u s E x p r e s s i o n V e c t o r s , A L a b o r a t o r y M a n u a l , W . H . F r e e m a n a n d C o m p a n y , N e w Y o r k (1992)、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、M o l e c u l a r B i o l o g y , A L a b o r a t o r y M a n u a l、B i o / T e c h n o l o g y , 6 , 47 (1988) 等に記載された方法によって、蛋白質を生産することができる。

30

即ち、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を生産させることができる。

該方法において用いられる遺伝子導入ベクターとしては、例えば、p V L 1 3 9 2、p V L 1 3 9 3、p B l u e B a c I I I (いずれもインビトロジェン社製) 等をあげることができる。

40

バキュロウイルスとしては、例えば、夜盗蛾科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラフア・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス (A u t o g r a p h a c a l i f o r n i c a n u c l e a r p o l y h e d r o s i s v i r u s) 等を用いることができる。

昆虫細胞としては、スポドプテラ・フルギベルダ (S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a) の卵巣細胞、トリコプルシア・ニ (T r i c h o p l u s i a n i) の卵巣細胞、カイコ卵巣由来の培養細胞等を用いることができる。

スポドプテラ・フルギベルダの卵巣細胞としては S f 9、S f 2 1 (バキュロウイルス・イクスプレッション・ベクターズ ア・ラボラトリー・マニュアル) 等、トリコプルシア・ニの卵巣細胞としては H i g h 5、B T I - T N - 5 B 1 - 4 (インビトロジェン社

50

製)等、カイコ卵巣由来の培養細胞としてはボンビクス・モリ (Bombyx mori) N4等をあげることができる。

組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への上記組換え遺伝子導入ベクターと上記バキュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法(特開平2-227075)、リポフェクション法[Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84, 7413 (1987)]等をあげることができる。

植物細胞を宿主細胞として用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、Tiプラスミド、タバコモザイクウイルスベクター等をあげることができる。

プロモーターとしては、植物細胞中で機能するものであればいずれのものを用いてもよく、例えば、カリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーター、イネア

10

クチン1プロモーター等をあげることができる。

宿主細胞としては、タバコ、ジャガイモ、トマト、ニンジン、ダイズ、アブラナ、アルファルファ、イネ、コムギ、オオムギ等の植物細胞等をあげることができる。

組換えベクターの導入方法としては、植物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)を用いる方法(特開昭59-140885、特開昭60-70080、WO94/00977)、エレクトロポレーション法(特開昭60-251887)、パーティクルガン(遺伝子銃)を用いる方法(特許第2606856、特許第2517813)等をあげることができる。

酵母、動物細胞、昆虫細胞または植物細胞により発現させた場合には、糖あるいは糖鎖が付加された蛋白質を得ることができる。

20

以上のようにして得られる形質転換体を培地に培養し、培養物中に本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

本発明の蛋白質を製造するための上記形質転換体の宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、植物細胞等いずれであってもよいが、好ましくは細菌、より好ましくはエシェリヒア属に属する微生物、さらに好ましくはエシェリヒア・コリに属する微生物をあげることができる。

上記形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

エシェリヒア・コリ等の原核生物あるいは酵母等の真核生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、該生物が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、形質転換体の培養を効率的に行える培地であれば天然培地、合成培地のいずれを用いてもよい。

30

炭素源としては、該生物が資化し得るものであればよく、グルコース、フラクトース、スクロース、これらを含有する糖蜜、デンプンあるいはデンプン加水分解物等の炭水化物、酢酸、プロピオン酸等の有機酸、エタノール、プロパノール等のアルコール類等を用いることができる。

窒素源としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の無機酸もしくは有機酸のアンモニウム塩、その他の含窒素化合物、並びに、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、コーンスチープリカー、カゼイン加水分解物、大豆粕および大豆粕加水分解物、各種発酵菌体、およびその消化物等を用いることができる。

40

無機塩としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等を用いることができる。

培養は、通常振盪培養または深部通気攪拌培養等の好氣的条件下で行う。培養温度は15~40℃がよく、培養時間は、通常5時間~7日間である。培養中pHは3.0~9.0に保持する。pHの調整は、無機または有機の酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリンやテトラサイクリン等の抗生物質を培地に添

50

加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、l a cプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド等を、t r pプロモーターを用いた発現ベクターで形質転換した微生物を培養するときにはインドールアクリル酸等を培地に添加してもよい。

動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているRPMI 1640培地 [J . A m . M e d . A s s o c . , 1 9 9 , 5 1 9 (1 9 6 7)]、イーグル (E a g l e) のMEM培地 [S c i e n c e , 1 2 2 , 5 0 1 (1 9 5 2)]、DMEM培地 [V i r o l o g y , 8 , 3 9 6 (1 9 5 9)]、199培地 [P r o c . S o c . B i o l . M e d . , 7 3 , 1 (1 9 5 0)] またはこれら培地に牛胎児血清等を添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 6 ~ 8、25 ~ 40、5%CO₂存在下等の条件下で1 ~ 7日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリン、ストレプトマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

昆虫細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているTNM - FH培地 (ファーミンジェン社製)、Sf - 900 II SFM培地 (ライフ・テクノロジーズ社製)、ExCell 400、ExCell 405 [いずれもJ R H バイオサイエンス社製]、Grace's Insect Medium [N a t u r e , 1 9 5 , 7 8 8 (1 9 6 2)] 等を用いることができる。

培養は、通常pH 6 ~ 7、25 ~ 30等の条件下で1 ~ 5日間行う。

また、培養中必要に応じて、ゲンタマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

植物細胞を宿主として得られた形質転換体は、細胞として、または植物の細胞や器官に分化させて培養することができる。該形質転換体を培養する培地としては、一般に使用されているムラシゲ・アンド・スクーグ (MS) 培地、ホワイ (White) 培地、またはこれら培地にオーキシン、サイトカイニン等、植物ホルモンを添加した培地等を用いることができる。

培養は、通常pH 5 ~ 9、20 ~ 40の条件下で3 ~ 60日間行う。

また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ハイグロマイシン等の抗生物質を培地に添加してもよい。

上記のとおり、本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNAを発現ベクターに連結した組換え体DNAを保有する微生物、昆虫細胞、動物細胞、あるいは植物細胞由来の形質転換体を、通常の培養方法に従って培養し、本発明の蛋白質を生成蓄積させ、該培養物より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

本発明の蛋白質の生産方法としては、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、あるいは宿主細胞外膜上に生産させる方法があり、選択した方法に応じて、生産させる蛋白質の構造を変えることができる。

本発明の蛋白質が宿主細胞内あるいは宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンらの方法 [J . B i o l . C h e m . , 2 6 4 , 1 7 6 1 9 (1 9 8 9)]、ロウらの方法 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , 8 6 , 8 2 2 7 (1 9 8 9)、G e n e s D e v e l o p . , 4 , 1 2 8 8 (1 9 9 0)]、または特開平05 - 336963、WO94 / 23021等に記載の方法を準用することにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

すなわち、遺伝子組換えの手法を用いて、本発明の蛋白質の活性部位を含む蛋白質の手前にシグナルペプチドを付加した形で生産させることにより、該蛋白質を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。

また、特開平2 - 227075に記載されている方法に準じて、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子等を用いた遺伝子増幅系を利用して生産量を上昇させることもできる。

さらに、遺伝子導入した動物または植物の細胞を再分化させることにより、遺伝子が導入された動物個体（トランスジェニック非ヒト動物）または植物個体（トランスジェニック植物）を造成し、これらの個体を用いて本発明の蛋白質を製造することもできる。

本発明の蛋白質を生産する形質転換体が動物個体または植物個体の場合は、通常の方法に従って、飼育または栽培し、該蛋白質を生成蓄積させ、該動物個体または植物個体より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。

動物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば公知の方法 [Am. J. Clin. Nutr., 63, 639S (1996)、Am. J. Clin. Nutr., 63, 627S (1996)、Bio/Technology, 9, 830 (1991)] に準じて遺伝子を導入して造成した動物中に本発明の蛋白質を生産する方法があげられる。

10

動物個体の場合は、例えば、本発明のDNAまたは本発明の製造法に用いられるDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、本発明の蛋白質を該動物中に生成、蓄積させ、該動物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を製造することができる。該動物中の該蛋白質を生成、蓄積させる場所としては、例えば、該動物のミルク（特開昭63-309192）、卵等をあげることができる。この際に用いられるプロモーターとしては、動物で機能するものであればいずれも用いることができるが、例えば、乳腺細胞特異的なプロモーターであるカゼインプロモーター、カゼインプロモーター、ラクトグロブリンプロモーター、ホエー酸性プロテインプロモーター等が好適に用いられる。

20

植物個体を用いて本発明の蛋白質を製造する方法としては、例えば本発明の蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック植物を公知の方法 [組織培養, 20 (1994)、組織培養, 21 (1995)、Trends Biotechnol., 15, 45 (1997)] に準じて栽培し、該蛋白質を該植物中に生成、蓄積させ、該植物中より該蛋白質を採取することにより、該蛋白質を生産する方法があげられる。

本発明の蛋白質を生産する形質転換体を用いて製造された本発明の蛋白質を単離・精製する方法としては、通常の酵素の単離、精製法を用いることができる。

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で生産された場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液にけん濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、ダイノミル等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。

30

該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の酵素の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル (DEAE) - セファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等レジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF (ファルマシア社製) 等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

40

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成して生産された場合は、同様に細胞を回収後破砕し、遠心分離を行うことにより得られた沈殿画分より、通常の方法により該蛋白質を回収後、該蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。

該可溶化液を、蛋白質変性剤を含まないあるいは蛋白質変性剤の濃度が蛋白質が変性しない程度に希薄な溶液に希釈、あるいは透析し、該蛋白質を正常な立体構造に構成させた後、上記と同様の単離精製法により精製標品を得ることができる。

本発明の蛋白質またはその糖修飾体等の誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清に該蛋白質またはその糖付加体等の誘導体を回収することができる。

即ち、該培養物を上記と同様の遠心分離等の手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を

50

得ることができる。

このようにして取得される蛋白質として、例えば、配列番号 1 ~ 8 のいずれかで表されるアミノ酸配列からなる蛋白質をあげることができる。

また、本発明の蛋白質を他の蛋白質との融合蛋白質として生産し、融合した蛋白質に親和性をもつ物質を用いたアフィニティークロマトグラフィーを利用して精製することもできる。例えば、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、特開平 5 - 336963、WO 94 / 23021 に記載の方法に準じて、本発明の蛋白質をプロテイン A との融合タンパク質として生産し、イムノグロブリン G を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる。

10

また、本発明の蛋白質を Flag ペプチドとの融合蛋白質として生産し、抗 Flag 抗体を用いるアフィニティークロマトグラフィーにより精製することができる [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]。更に、該蛋白質自身に対する抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーで精製することもできる。

上記で取得された蛋白質のアミノ酸配列情報を基に、Fmoc 法 (フルオレニルメチルオキシカルボニル法)、tBoc 法 (t - ブチルオキシカルボニル法) 等の化学合成法により、本発明の蛋白質を製造することができる。また、Advanced ChemTech 社、パーキン・エルマー社、Pharmacia 社、Protein Technology Instrument 社、Synthecell - Vega 社、PerSeptive 社、島津製作所等のペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

20

(iii) 本発明のジペプチドの製造法

(1) 酵素的製造法

ジペプチドの酵素的製造法としては、本発明の蛋白質、1 種以上のアミノ酸、および ATP を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式 (I) で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する方法をあげることができる。

上記製造法において、基質に用いられる 1 種以上のアミノ酸、好ましくは 1 または 2 種のアミノ酸としては、1 種のアミノ酸として L - アラニンを用いる場合を除き、アミノ酸、好ましくは L - アミノ酸、グリシン (Gly) および - アラニン (Ala) からなる群より選ばれるアミノ酸であれば、いずれのアミノ酸をいずれの組み合わせで用いてもよい。L - アミノ酸としては、例えば L - アラニン (L - Ala)、L - グルタミン (L - Gln)、L - グルタミン酸 (L - Glu)、L - バリン (L - Val)、L - ロイシン (L - Leu)、L - イソロイシン (L - Ile)、L - プロリン (L - Pro)、L - フェニルアラニン (L - Phe)、L - トリプトファン (L - Trp)、L - メチオニン (L - Met)、L - セリン (L - Ser)、L - スレオニン (L - Thr)、L - システイン (L - Cys)、L - アスパラギン (L - Asn)、L - チロシン (L - Tyr)、L - リジン (L - Lys)、L - アルギニン (L - Arg)、L - ヒスチジン (L - His)、L - アスパラギン酸 (L - Asp)、L - - アミノ酪酸 (L - - AB)、L - アザセリン (L - Azaserine)、L - テアニン (L - theanine)、L - 4 - ヒドロキシプロリン (L - 4 - HYP)、L - 3 - ヒドロキシプロリン (L - 3 - HYP)、L - オルニチン (L - Orn)、L - シトルリン (L - Cit) および L - 6 - ジアゾ - 5 - オキソノルロイシン (L - 6 - diazo - 5 - oxo - norleucine) などあげることができる。

30

40

上記製造法に用いられる、より好ましいアミノ酸としては、L - Ala、Gly、L - Met、L - Ser、L - Thr および - Ala から選ばれる 1 種のアミノ酸と 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、L - - AB、- Ala、L - Azaserine、L - theanine、L - 4 - HYP、L - 3 - HYP、L - Orn、L - Cit および L - 6 - diazo - 5 - oxo - nor

50

leucineから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ(ただし、L-Ala同士の組み合わせを除く)、L-GlnとL-Pheの組み合わせ、およびL- -ABとL-Gln、L-ArgまたはL- -ABの組み合わせ、さらに好ましくはL-AlaとL-Gln、Gly、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Phe、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Asn、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L-His、L- -AB、L-Azaserine、L-CitおよびL-theanineから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、GlyとL-Gln、Gly、L-Phe、L-Trp、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Tyr、L-Lys、L-Arg、L- -ABおよびL-Citから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L-MetとL-Phe、L-Met、L-Ser、L-Thr、L-Cys、L-Tyr、L-LysおよびL-Hisから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L-SerとL-Gln、L-Phe、L-Ser、L-Thr、L-Tyr、L-HisおよびL- -ABから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L-ThrとL-Gln、L-Phe、L-Leu、L-ThrおよびL- -ABから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、L-GlnとL-Pheの組み合わせ、 -AlaとL-Phe、L-Met、L-HisおよびL-Citから選ばれる1種のアミノ酸の組み合わせ、およびL- -ABとL-Gln、L-ArgまたはL- -ABの組み合わせをあげることができる。

10

上記製造法において、本発明の蛋白質は、基質として用いるアミノ酸1mgあたり0.01~100mg、好ましくは0.1mg~10mg添加する。

20

上記製造法において、基質として用いるアミノ酸は、0.1~500g/L、好ましくは0.2~200g/Lの濃度になるように水性媒体中に初発または反応途中に添加する。

上記製造法において、エネルギー源として用いるATPは、0.5mmol~10mol/Lの濃度で用いる。

上記製造法で用いられる水性媒体としては、ジペプチドの生成反応を阻害しない限り、いかなる成分、組成の水性媒体であってもよく、例えば、水、りん酸塩、炭酸塩、酢酸塩、ほう酸塩、クエン酸塩、トリスなどの緩衝液などをあげることができる。また、メタノール、エタノールなどのアルコール類、酢酸エチルなどのエステル類、アセトンなどのケトン類、アセトアミドなどのアミド類を含有していてもよい。

30

ジペプチドの生成反応は水性媒体中、pH5~11、好ましくはpH6~10、20~50、好ましくは25~45の条件で2~150時間、好ましくは6~120時間行う。

上記方法で製造されるジペプチドとしては、式(I)で表されるジペプチドをあげることができ、好ましくは、式(I)においてR¹およびR²が同時にまたは異なって、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、L- -AB、 -Ala、L-Azaserine、L-theanine、L-4-HYP、L-3-HYP、L-Orn、L-CitおよびL-6-diazo-5-oxo-norleucineから選ばれるアミノ酸であるジペプチド(ただし、R¹およびR²は、同時にL-Alaである場合を除く)をあげることができ、より好ましくはR¹がL-Ala、Gly、L-Met、L-Ser、L-Thrまたは -Alaの場合は、R²が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、L- -AB、 -Ala、L-Azaserine、L-theanine、L-4-HYP、L-3-HYP、L-Orn、L-CitまたはL-6-diazo-5-oxo-norleucineであるジペプチドをあげることができ、さらに好ましくは、R¹がL-Alaの場合は、R²はL-Gln、Gly、L-Val、L-Leu、L-Ile、L-Phe

40

50

、L - Trp、L - Met、L - Ser、L - Thr、L - Cys、L - Asn、L - Tyr、L - Lys、L - Arg、L - His、L - - AB、L - Azaserine、L - theanineまたはL - Citであるジペプチド、R¹がGlyの場合は、R²はL - Gln、Gly、L - Phe、L - Trp、L - Met、L - Ser、L - Thr、L - Cys、L - Tyr、L - Lys、L - Arg、L - - ABまたはL - Citであるジペプチド、R¹がL - Metの場合は、R²はL - Phe、L - Met、L - Cys、L - Tyr、L - LysまたはL - Hisであるジペプチド、R¹がL - Serの場合は、R²はL - Gln、Gly、L - Phe、L - Met、L - Ser、L - Thr、L - Tyr、L - HisまたはL - - ABであるジペプチド、R¹がL - Thrの場合は、R²はL - Gln、L - Leu、L - Phe、L - Met、L - Ser、L - ThrまたはL - - ABであるジペプチド、R¹がL - Glnの場合は、R²はL - PheまたはL - - ABであるジペプチド、R¹がL - Pheの場合は、R²はL - Glnであるジペプチド、R¹がL - Trpの場合は、R²はGlyであるジペプチド、R¹がL - Cysの場合は、R²はL - Ala、L - Gln、Gly、またはL - Metであるジペプチド、R¹がL - Lysの場合は、R²はL - Ala、GlyまたはL - Metであるジペプチド、R¹がL - Alaの場合は、R²はL - Phe、L - MetまたはL - Hisであるジペプチド、R¹がL - Argの場合は、R²はL - - ABであるジペプチド、R¹がL - Hisである場合は、R²はL - Metであるジペプチド、およびR¹がL - - ABの場合は、R²はL - Ala、L - Gln、Gly、L - Ser、L - Thr、L - ArgまたはL - - ABであるジペプチドをあげることができる。

(2) 形質転換体または微生物の培養物もしくは培養物の処理物を酵素源として用いる製造法

形質転換体または微生物の培養物もしくは培養物の処理物を酵素源として用いるジペプチドの製造法としては、本発明の蛋白質を生産する能力を有する形質転換体、または本発明の蛋白質を生産する能力を有する微生物の培養物もしくは培養物の処理物を酵素源に用い、該酵素源、および1種以上のアミノ酸を水性媒体中に存在せしめ、該媒体中に式(I)で表されるジペプチドを生成、蓄積させ、該媒体から該ジペプチドを採取する該ジペプチドの製造法をあげることができる。

上記製造法に用いられる形質転換体としては、上記(i i)の方法により製造することができる、本発明の蛋白質を生産する形質転換体をあげることができる。該形質転換体の宿主としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等、植物細胞等をあげることができ、好ましく細菌、より好ましくはエシェリヒア属、バチルス属またはコリネバクテリウム属に属する微生物をあげることができる。

エシェリヒア属に属する微生物としては、好ましくはエシェリヒア・コリに属する微生物等をあげることができ、バチルス属に属する微生物としては好ましくはバチルス・サチリスまたはバチルス・メガテリウム等に属する微生物をあげることができ、コリネバクテリウム属に属する微生物としては好ましくはコリネバクテリウム・グルタミカムまたはコリネバクテリウム・アンモニアゲネス等に属する微生物をあげることができる。

上記製造法に用いられる微生物は、本発明の蛋白質を生産する能力を有する微生物であれば、いずれの微生物であってもよく、好ましくはバチルス属に属する微生物、より好ましくはバシリシン合成活性を有するバチルス属に属する微生物、さらに好ましくはバチルス・サチリス、バチルス・アミロリケファシエンス、バチルス・コアギュランス、バチルス・リケニフォルミス、バチルス・メガテリウムおよびバチルス・プミルスからなる群より選ばれる種に属する微生物、最も好ましくは、バチルス・サチリスATCC 15245、バチルス・サチリスATCC 6633、バチルス・サチリスIAM 1213、バチルス・サチリスIAM 1107、バチルス・サチリスIAM 1214、バチルス・サチリスATCC 9466、バチルス・サチリスIAM 1033、バチルス・サチリスATCC 21555、バチルス・アミロリケファシエンスIFO 3022およびバチルス・プミルスNRRL B - 12025からなる群より選ばれる株である微生物をあげることができる。

培養物の処理物としては、培養物の濃縮物、培養物の乾燥物、培養物を遠心分離して得

られる菌体、該菌体の乾燥物、該菌体の凍結乾燥物、該菌体の界面活性剤処理物、該菌体の超音波処理物、該菌体の機械的摩砕処理物、該菌体の溶媒処理物、該菌体の酵素処理物、該菌体の蛋白質分画物、該菌体の固定化物あるいは該菌体より抽出して得られる酵素標品などをあげることができる。

上記製造法において、基質として用いるアミノ酸の種類、使用濃度および添加時期、並びに生産されるジペプチドは、上記(iii)の(1)の酵素的製造法のものと同様である。

また、微生物の培養物または該培養物の処理物を酵素源とした製造法において用いられる水性媒体としては、上記(iii)の(1)の酵素的製造法に用いられる水性媒体に加え、酵素源として用いた形質転換体または微生物の培養液も水性媒体として用いることができる。

10

また上記製造法においては、必要に応じて、ATPの供給源として、ATPまたは形質転換体もしくは微生物が代謝してATPを生産し得る化合物、例えばグルコースのような糖類、エタノールのようなアルコール類、酢酸のような有機酸類などを水性媒体中に加えることができる。

さらに必要に応じて、水性媒体中に界面活性剤あるいは有機溶媒を添加してもよい。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン・オクタデシルアミン(例えばナイミンS-215、日本油脂社製)などの非イオン界面活性剤、セチルトリメチルアンモニウム・ブロマイドやアルキルジメチル・ベンジルアンモニウムクロライド(例えばカチオンF2-40E、日本油脂社製)などのカチオン系界面活性剤、ラウロイル・ザルコシネートなどのアニオン系界面活性剤、アルキルジメチルアミン(例えば三級アミンFB、日本油脂社製)などの三級アミン類など、ジペプチドの生成を促進するものであればいずれでもよく、1種または数種を混合して使用することもできる。界面活性剤は、通常0.1~50g/lの濃度で用いられる。有機溶剤としては、キシレン、トルエン、脂肪族アルコール、アセトン、酢酸エチルなどがあげられ、通常0.1~50ml/lの濃度で用いられる。

20

培養物または該培養物の処理物を酵素源として用いる場合、該酵素源の量は、当該酵素源の比活性等により異なるが、例えば、基質として用いるアミノ酸1mgあたり湿菌体量として5~1000mg、好ましくは10~400mg添加する。

ジペプチドの生成反応は水性媒体中、pH5~11、好ましくはpH6~10、20~65、好ましくは25~55、より好ましくは30~45の条件で通常1分間~150時間、好ましくは3分間~120時間、より好ましくは30分間~100時間行う。

30

上記(iii)の(1)または(2)の製造法において、水性媒体中に生成、蓄積したジペプチドの採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法あるいは、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

【図面の簡単な説明】

第1図はプラスミドpPE43の構築過程を示す図である。

第2図はプラスミドpQE60ywfEの構築過程を示す図である。

また、図中のywfEは、バチルス・サチリス168株由来のywfE遺伝子、Ptrpはトリプトファンプロモーター遺伝子、PT5はT5プロモーター遺伝子を表す。

40

【発明を実施するための最良の形態】

以下に、実施例を示すが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例1 データベースを利用したジペプチド合成活性を有する蛋白質の検索

バチルス・サチリス168株由来のD-Ala-D-Alaリガーゼ遺伝子のアミノ酸配列[Nature, 390, 249-256(1997)]をクエリーとして、バチルス・サチリス168株のゲノムDNAのデータベースであるSubtilist(http://genolist.pasteur.fr/Subtilist/)のホモロジー検索機能を用いて、バチルス・サチリス168株のゲノムDNA配列中に存在する相同性を有する蛋白質をコードする遺伝子を検索した。

その結果抽出された配列のうち、D-Ala-D-Alaリガーゼモチーフ[Bioc

50

hemistry, 30, 1673 (1991)]である配列番号33、34または35で表されるアミノ酸配列をコードし、かつ既にその機能が同定されている蛋白質をコードする遺伝子を排除したもののうち、D-Ala-D-Alaリガーゼモチーフと最も高い相同性(29.1%)を示すものとして機能未知遺伝子 $ywfE$ を選択した。

$ywfE$ の塩基配列を配列番号9、該塩基配列にコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号1に示した。

実施例2 $ywfE$ 遺伝子発現株の造成

実施例1で得られた塩基配列情報に従い、バチルス・サチリスの $ywfE$ 遺伝子断片を以下のようにして取得した。

まず、バチルス・サチリス168株(ATCC 23857)をLB培地[10g/lバクトトリプトン(ディフコ社製)、5g/lイーストエキス(ディフコ社製)、5g/l塩化ナトリウム]に植菌し30で一晩静置培養した。培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の飽和フェノールを用いる方法により、該微生物の染色体DNAを単離精製した。

パーセプティブ・バイオシステムズ(Perseptive Biosystems)社製8905型DNA合成機を用いて、配列番号19~22で表される塩基配列を有するDNA(以下、それぞれプライマーA、プライマーB、プライマーCおよびプライマーDと呼ぶ)を合成した。プライマーAは、バチルス・サチリスの染色体DNAの $ywfE$ の開始コドンを含む領域の5'末端にXhoI認識配列を含む塩基配列を付加したものである。プライマーBは、 $ywfE$ の終止コドンを含む配列と相補的な塩基配列の5'末端にBamHI認識配列を含む塩基配列を付加したものである。またプライマーCは、trpプロモーターを含む発現ベクターpTrs30[エシェリヒア・コリJM109/pTrs30(FERM BP-5407)より調製]のtrpプロモーター領域の塩基配列の5'末端にEcoRI認識配列を含む塩基配列を付加したものである。プライマーDは、trpプロモーターを含む発現ベクターpTrs30のtrpプロモーター領域の配列と相補的な配列の5'末端にXhoI認識配列を含む塩基配列を付加したものである。

$ywfE$ 遺伝子断片の増幅には上記のプライマーAおよびプライマーB、鋳型としてバチルス・サチリスの染色体DNAを用い、trpプロモーター領域の断片の増幅にはプライマーCおよびプライマーD、鋳型としてpTrs30を用いてPCRを行った。PCRは、鋳型として0.1μgの染色体DNAまたは10ngのpTrs30、0.5μmol/Lの各プライマー、2.5unitsのPfu DNAポリメラーゼ(ストラタジーン社製)、4μLのPfu DNAポリメラーゼ用x10緩衝液(ストラタジーン社製)、各200μmol/LのdNTP(dATP、dGTP、dCTPおよびdTTP)を含む反応液40μLを調製し、94で1分間、55で2分間、72で3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、プライマーAおよびプライマーBを用いたPCRでは $ywfE$ 遺伝子断片に相当する約1.4kb、プライマーCおよびプライマーDを用いた反応ではtrpプロモーター領域のDNA断片に相当する約0.3kbのDNA断片がそれぞれ増幅していることを確認した後、残りの反応液と等量のTE[10mmol/L Tris-HCl(pH8.0)、1mmol/L EDTA]飽和フェノール/クロロホルム(1vol/1vol)溶液を添加し、混合した。該溶液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80に30分間放置した。該溶液を遠心分離してDNAを沈殿させた後、該DNAを20μLのTEに溶解した。

該溶解液それぞれ5μLを用い、プライマーAおよびプライマーBで増幅したDNAを制限酵素XhoIおよびBamHIで、またプライマーCおよびプライマーDで増幅したDNAを制限酵素EcoRIおよびXhoIで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンIIキット(GENE CLEAN II kit、BIO 101社製)を用いて、 $ywfE$ を含む1.4kbおよびtrpプロモーター領域を含む0.3kbのDNA断片をそれぞれ回収した。

t r pプロモーターを含む発現ベクター p T r S 3 0 [エシェリヒア・コリ J M 1 0 9 / p T r S 3 0 (F E R M B P - 5 4 0 7) より調製] 0 . 2 μ g を制限酵素 E c o R I および B a m H I で切断後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離し、上記と同様の方法により 4 . 5 k b の DNA 断片を回収した。

上記で得られた y w f E を含む 1 . 4 k b 断片、t r pプロモーター領域を含む 0 . 3 k b 断片および 4 . 5 k b の断片をライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて、16 で 16 時間反応させ連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリ N M 5 2 2 株 (ストラタジーン社製) を、カルシウムイオンを用いる方法 [P r o c . N a t l . A c a d . S c i . , U S A , 6 9 , 2 1 1 0 (1 9 7 2)] によって形質転換し、該形質転換体を 5 0 μ g / m l のアンピシリンを含む L B 寒天培地に塗布した後、30 で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析することにより、t r pプロモーター下流に y w f E が連結された発現ベクターである p P E 4 3 が取得されていることを確認した (図 1)。

実施例 3 ジペプチドの生産

実施例 2 で得られた p P E 4 3 を保有するエシェリヒア・コリ N M 5 2 2 (エシェリヒア・コリ N M 5 2 2 / p P E 4 3 株) を 5 0 μ g / m l のアンピシリンを含む 8 m l の L B 培地が入った太型試験管に接種し、28 で 17 時間培養した。該培養液を遠心分離し、湿菌体を取得した。

終濃度 6 0 m g / m l の該湿菌体、1 2 0 m m o l / L のリン酸カリウムバッファー (p H 7 . 4)、6 0 m m o l / L の塩化マグネシウム、6 0 m m o l / L の A T P、3 0 m m o l / L の L - A l a、3 0 m m o l / L の L - G l n、0 . 4 % のナイミーン S - 2 1 5 からなる 0 . 1 m l の反応液を調製し、37 で 3 分間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をジニトロフェノール化法で誘導体化した後に H P L C 法により分析した。H P L C 法による分析は、分離カラムに関東化学社製の L i c h r o s o r b - R P - 1 8 カラムを用い、溶離液として 1 % (v / v) リン酸、2 5 % (v / v) アセトニトリルを用い、0 . 7 m l / 分の流動速度で行った。その結果反応液中に 1 2 0 m g / L の L - アラニル - L - グルタミン (L - A l a - L - G l n) が生成蓄積していることを確認した。

対照菌株であるベクターのみを含むエシェリヒア・コリ N M 5 2 2 / p T r S 3 1 株の菌体では L - A l a - L - G l n の生成は認められなかった。

実施例 4 C 末端 H i s タグ付加型組換え型ジペプチド合成酵素の精製

上記 DNA 合成機を用いて、配列番号 2 3 および 2 4 で表される塩基配列を有する DNA (以下、それぞれプライマー E、プライマー F と呼ぶ) を合成した。プライマー E は、y w f E の開始コドン (a t g) を N c o I 認識配列 (c c a t g g) に置換した領域を含む塩基配列である。プライマー F は、y w f E の終止コドンを B a m H I 認識配列 (g g a t c c) に置換した領域を含む塩基配列である。

バチルス・サチリス 1 6 8 株 (A T C C 2 3 8 5 7) の染色体 DNA を鋳型とし、上記プライマー E およびプライマー F をプライマーセットとして用いて P C R を行った。P C R は、0 . 1 μ g の染色体 DNA、0 . 5 μ m o l / L の各プライマー、2 . 5 u n i t s の P f u DNA ポリメラーゼ、4 μ L の P f u DNA ポリメラーゼ用 x 1 0 緩衝液、2 0 0 μ m o l / L の各 d N T P を含む反応液 4 0 μ L を調製し、94 で 1 分間、55 で 2 分間、72 で 3 分間の工程を 3 0 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1 / 1 0 量をアガロースゲル電気泳動し、y w f E 断片に相当する約 1 . 4 k b の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の T E 飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該溶液を遠心分離して得られた上層に、2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、- 8 0 に 3 0 分間放置した。該溶液を遠心分離して得られた DNA の沈殿を 2 0 μ L の T E に溶解した。

該溶解液 5 μ L を用い、増幅した DNA を制限酵素 N c o I および B a m H I で切断し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した後、ジーンクリーン I I キットを

10

20

30

40

50

用いて、y w f Eを含む1.4 kbのDNA断片を回収した。

C末端Hisタグ付加型組換え体発現ベクターpQE60(キアゲン社製)0.2gを制限酵素NcoIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、上記と同様の方法により3.4 kbのDNA断片を回収した。

上記で得られたy w f Eを含む1.4 kbのDNA断片と3.4 kbのDNA断片をライゲーションキットを用いて、16℃で16時間反応させ連結した。

該連結反応液を用いてエシェリヒア・コリNM522株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換し、該形質転換体を50 µg/mlのアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布した後、30℃で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーから公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析することにより、C末端Hisタグ付加型y w f E発現ベクターであるpQE60 y w f Eが取得されていることを確認した(図2)。

pQE60 y w f Eを保有するエシェリヒア・コリNM522(エシェリヒア・コリNM522/pQE60 y w f E株)を、50 µg/mlのアンプシリンを含む8 mlのLB培地の入った太型試験管に接種し28℃で17時間培養した。該培養液を50 µg/mlのアンプシリンを含む50 mlのLB培地の入った250 ml容三角フラスコに接種し30℃で3時間培養した後、終濃度が1 mmol/Lになるようにイソプロピル-D-チオガラクトピラノシド(IPTG)を添加し、さらに30℃で4時間培養した。該培養液を遠心分離して湿菌体を取得し、該湿菌体から、HisTrap(Hisタグ付加タンパク精製キット、Amersham Pharmacia Biotech社製)を用いて、説明書に従いHisタグ付加組換え型酵素を精製した。

実施例5 Hisタグ付加組換え型酵素を用いたジペプチドの生産(1)

(i) 実施例4で取得した精製したHisタグ付加組換え型酵素0.04 mg、100 mmol/LのTris-HCl(pH8.0)、60 mmol/Lの塩化マグネシウム、60 mmol/LのATP、30 mmol/LのL-Ala、30 mmol/LのL-Glnからなる0.1 mlの反応液を調製し、37℃で16時間反応を行った。

反応終了後、上記実施例3と同様の方法により反応生成物を分析し、反応液中に3.7 g/LのL-Ala-L-Glnと0.3 g/LのL-アラニル-L-アラニン(L-Ala-L-Ala)が生成蓄積していることを確認した。

(ii) 酵素を0.01 mg、L-Glnの代わりにL-Phe、L-Met、L-LeuまたはL-Valを含有する以外は、上記(i)の反応液の組成と同じ反応液を調製し、上記(i)の反応条件で反応させた。

反応終了後、上記実施例3と同様の方法により反応生成物を分析し、反応液中にそれぞれ、7.0 g/LのL-アラニル-L-フェニルアラニン(L-Ala-L-Phe)のみ、7.0 g/LのL-アラニル-L-メチオニン(L-Ala-L-Met)および0.03 g/LのL-Ala-L-Ala、5.0 g/LのL-アラニル-L-ロイシン(L-Ala-L-Leu)および0.2 g/LのL-Ala-L-Ala、または1.6 g/LのL-アラニル-L-バリン(L-Ala-L-Val)および0.3 g/LのL-Ala-L-Alaが生成蓄積していることを確認した。

(iii) 酵素を0.01 mg、L-Alaの代わりにGly、L-Glnの代わりにL-PheまたはL-Metを含有する以外は、上記(1)の反応液の組成と同じ反応液を調製し、上記(1)の反応条件で反応させた。

反応終了後、上記実施例3と同様の方法により反応生成物を分析し、反応液中にそれぞれ5.2 g/Lのグリシル-L-フェニルアラニン(Gly-L-Phe)または1.1 g/Lのグリシル-L-メチオニン(Gly-L-Met)が生成蓄積していることを確認した。

上記反応液組成からATPを除くとジペプチドは全く生成されなかった。

以上の結果から、y w f E遺伝子産物は、ATP存在下において、L-AlaとL-Gln、L-Phe、L-Met、L-LeuまたはL-Valとから、L-Ala-L-GlnおよびL-Ala-L-Ala、L-Ala-L-Phe、L-Ala-L-Me

10

20

30

40

50

tおよびL-Ala-L-Ala、L-Ala-L-LeuおよびL-Ala-L-Ala、またはL-Ala-L-ValおよびL-Ala-L-Alaを生成する活性、GlyとL-PheまたはL-MetとからGly-L-PheまたはGly-L-Metを生成する活性を有することが明らかになった。

実施例6 Hisタグ付加組換え型酵素を用いたジペプチドの生産(2)

実施例4で得られた精製したHisタグ付加組換え型酵素0.04mg、100mmol/LのTris-HCl(pH8.0)、60mmol/Lの塩化マグネシウム、60mmol/LのATPからなる0.1mlの反応液を調製し、表1の第1行目と最左列のアミノ酸の組み合わせからなる各種L-アミノ酸、Glyまたは-Alaをそれぞれ30mmol/Lずつになるように反応液に添加し、37℃で16時間反応を行った。反応終了後、反応生成物をHPLC分析したところ、第1表に示すジペプチドが生成していることが確認された。

第1表-1

	Ala	Gln	Glu	Gly	Val	Leu	Ile	Pro
Ala	AlaAla	AlaGln AlaAla	AlaAla	AlaGly AlaAla	AlaVal AlaAla	AlaLeu AlaAla	AlaIle AlaAla	AlaAla
Gln		×	×	GlyGln GlyGly	×	×	×	×
Glu				GlyGly				
Gly				GlyGly				GlyGly
Val								
Leu								
Ile								
Pro								
Phe								
Trp								
Met								
Ser								
Thr								
Cys								
Asn								
Tyr								
Lys								
Arg								
His								
Asp								
αAB								
β-Ala								
Cit								

第1表-2

	Phe	Trp	Met	Ser	Thr	Cys	Asn	Tyr
Ala	AlaPhe AlaAla	AlaTrp AlaAla	AlaMet	AlaSer AlaAla	AlaThr AlaAla	AlaAla ○	AlaAsn AlaAla	AlaTyr AlaAla
Gln	○	×	MetMet	SerGln SerSer	ThrGln ThrThr	○	×	×
Glu								
Gly	GlyPhe	GlyGly ○	GlyMet GlyGly	GlySer GlyGly SerGly SerSer	GlyThr GlyGly ThrGly ThrThr	GlyGly ○	GlyGly	GlyTyr GlyGly
Val			×					
Leu			MetMet		ThrLeu			
Ile			MetMet					
Pro			MetMet	SerSer	ThrThr			
Phe			MetPhe MetMet	SerPhe	ThrPhe ThrThr			
Trp								
Met			MetMet	SerMet	ThrMet ThrThr	MetMet ○		MetTyr MetMet
Ser				SerSer	SerThr SerSer ThrSer ThrThr			SerTyr SerSer
Thr					ThrThr			
Cys								
Asn								
Tyr								
Lys								
Arg								
His								
Asp								
α -AB								
β -Ala								
Cit								

10

20

30

第1表-3

	Lys	Arg	His	Asp	α -AB	β -Ala	Cit	アサギリン	デアニン
Ala	AlaAla ○	AlaArg AlaAla	AlaHis AlaAla	AlaAla	AlaAla ○		AlaAla ○	AlaAla ○	AlaAla ○
Gln	×	×	×	×	○				
Glu									
Gly	GlyGly ○	GlyArg GlyGly	GlyGly	GlyGly	GlyGly ○		○		
Val									
Leu									
Ile									
Pro									
Phe				×		○			
Trp									
Met	MetMet ○		MetMet ○			○			
Ser			SerHis		SerSer ○				
Thr					ThrThr ○				
Cys									
Asn									
Tyr									
Lys									
Arg					○				
His						β -AlaHis			
Asp									
α -AB					○				
β -Ala									
Cit						○			

第1表の第1行目と最左列に記載の2種類（もしくは1種類）のL-アミノ酸、Glyまたは -Alaを基質として反応した場合に生成したジペプチドを枠内に記載した。は配列は未確定だがジペプチドが生成したこと、×はジペプチドの生成が確認されなかったこと、および空欄は未実施を示す。

実施例7 Hisタグ付加組換え型酵素発現株を用いたジペプチドの生産

実施例4で得られたエシェリヒア・コリNM522/pQE60ywfE株を50 μ g/mlのアンピシリンを含む8mlのLB培地の入った太型試験管に接種し、28℃で17時間培養した。該培養液を50 μ g/mlのアンピシリンを含む50mlのLB培地の入った250ml容三角フラスコに接種し30℃で3時間培養した後、終濃度が1mmol/Lになるようにイソプロピル - D - チオガラクトピラノシド (IPTG) を添加し、さらに30℃で4時間培養した。該培養液を遠心分離し湿菌体を取得した。

200g/Lの湿菌体、50g/Lのグルコース、5g/Lのフィチン酸（33%の濃水酸化ナトリウム溶液を用いて中性になるよう希釈）、15g/Lのリン酸二水素カリウム、5g/Lの硫酸マグネシウム・7水和物、4g/LのナイミーンS-215、10ml/Lのキシレン、200mmol/LのL-Ala、200mmol/LのL-Glnからなる20mlの反応液（pH7.2）を50ml容量のビーカーに入れ、32℃、900rpmの条件下で2時間反応を行った。反応中は2mol/Lの水酸化カリウムを用いて反応液のpHを7.2に保った。

反応生成物を実施例3記載の方法と同様の方法で分析したところ、25mg/LのL-Ala-L-Glnの蓄積が確認された。

実施例8 バチルス属に属する各種微生物からのywfE遺伝子に相当する遺伝子のクロ

ーニングとその解析

配列番号9で表される塩基配列に基づき、バチルス・サチリスATCC15245、ATCC6633、IAM1213、IAM1107、IAM1214、ATCC9466、IAM1033、ATCC21555、バチルス・アミノリケファシエンスIFO3022、およびバチルス・プミルスNRRL B-12025に存在するywfE遺伝子に相当する遺伝子を以下のようにして取得した。

まず、バチルス・サチリスATCC15245、ATCC6633、IAM1213、IAM1107、IAM1214、ATCC9466、IAM1033、ATCC21555、バチルス・アミノリケファシエンスIFO3022、およびバチルス・プミルスNRRL B-12025をそれぞれLB培地に植菌し30で一晚静置培養した。培養後、カレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジーに記載の飽和フェノールを用いる方法により、該微生物の染色体DNAをそれぞれ単離精製した。

パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成機を用いて、配列番号25および26で表される塩基配列を有するDNA（以下、それぞれプライマーG、プライマーHと呼ぶ）を合成した。プライマーGは、バチルス・サチリス168株の染色体DNAのywfEの開始コドンより上流を含む領域の配列である。プライマーHは、ywfEの終始コドンより下流を含む配列と相補的な配列である。

バチルス・サチリスATCC15245、ATCC6633、IAM1213、IAM1107、IAM1214、ATCC9466、IAM1033、ATCC21555、またはバチルス・アミノリケファシエンスIFO3022の染色体DNAを鋳型とし、上記プライマーGおよびプライマーHをプライマーセットとして用いてPCRを行った。PCRは、0.1μgの染色体DNA、0.5μmol/Lの各プライマー、2.5unitsのPfu DNAポリメラーゼ、4μLのPfu DNAポリメラーゼ用×10緩衝液、200μmol/Lの各dNTPを含む反応液40μLを調製し、94で1分間、55で2分間、72で3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、ywfE断片に相当する約1.6kbの断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該溶液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20μLのTEに溶解した。

上記で得られた各菌株染色体DNA由来の1.4kb断片とPCR-blunt（インビトロジェン社製）を、ライゲーションキットを用いて、16で16時間反応を行い連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリNM522株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換し、該形質転換体を50μg/mlのアンピシリンを含むLB寒天培地に塗布した後、30で一晚培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてそれぞれの構造を解析することにより、ywfE遺伝子に相当する遺伝子を含むプラスミドであるpYWFE1（ATCC15245株由来、配列番号36で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE2（ATCC6633株由来、配列番号10で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE3（IAM1213株由来、配列番号11で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE4（IAM1107株由来、配列番号12で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE5（IAM1214株由来、配列番号13で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE6（ATCC9466株由来、配列番号9で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE7（IAM1033株由来、配列番号36で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE8（ATCC21555株由来、配列番号14で表される塩基配列を有するDNA）、pYWFE9（IFO3022株由来、配列番号15で表される塩基配列を有するDNA）が取得されていることを確認した。

一方、バチルス・プミルスNRRL B-12025由来のywfEに相当する遺伝子

(配列番号 16 で表される塩基配列を有する DNA) は以下のように取得した。

上記で調製した NRRL B - 12025 株の染色体 DNA を鋳型にし、配列番号 27 および 28 で表される塩基配列からなる DNA をプライマーセットとして用いて、PCR を行った。PCR は、0.1 µg の染色体 DNA、0.5 µmol/L の各プライマー、2.5 units の Z - taq ポリメラーゼ (宝酒造社製)、5 µL の Z - taq ポリメラーゼ用 × 10 緩衝液 (宝酒造社製)、200 µmol/L の各 dNTP を含む反応液 50 µL を調製し、98 °C で 5 秒間、55 °C で 30 秒間、72 °C で 1 分間の工程を 30 回繰り返すことにより行った。

該反応液の 1/10 量をアガロースゲル電気泳動し、約 0.8 kb の断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量の TE 飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離して得られた上層に、2 倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 °C に 30 分間放置した。該溶液を遠心分離して得られた DNA の沈殿を 20 µL の TE に溶解した。

上記で得られた各菌株染色体 DNA 由来の 0.8 kb 断片と pGEM T - easy (プロメガ社製) を、ライゲーションキットを用いて、16 °C で 16 時間反応を行い連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリ DH5 株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換し、該形質転換体を 50 µg/ml のアンピシリンを含む LB 寒天培地に塗布した後、30 °C で一晩培養した。

上記で得られた形質転換体からプラスミドを抽出して、約 0.8 kb の挿入 DNA 断片の塩基配列を決定したところ、配列番号 16 で表される塩基配列中の塩基番号 358 ~ 1160 番からなる塩基配列が確認された。

次に該プラスミドを EcoRI で切断した後、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した。該 DNA 断片をジーンクリーン II キットを用いて精製した。約 0.5 µg の該精製 DNA 断片を、DIG - ハイプライム DNA ラベリング & デテクション スターターキット I (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) を用いて、DIG ラベル化した。DIG ラベル化は、該キット添付の説明書に従って行った。

上記で得られた DIG ラベル化 DNA を用いて、NRRL B - 12025 株の染色体 DNA のサザン解析を行った。

NRRL B - 12025 株の染色体 DNA を BamHI、EcoRI、HindIII、KpnI、PstI、SacI、SalI および SphI を用いてそれぞれ完全消化し、アガロース電気泳動により DNA 断片を分離した後、常法に従いナイロンメンブレンプラスチャージ (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) に転移させた。

UV を照射することにより、該ナイロン膜に DNA 断片を固定した後、上記プローブ DNA および該ナイロン膜を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーションは、該プローブ DNA と該ナイロン膜を 65 °C で 16 時間接触させ、その後該ナイロン膜を、0.1 % SDS および 2 × SSC からなる溶液を用い、室温で 5 分間、2 回洗浄し、さらに 0.1 % SDS および 0.5 × SSC からなる溶液を用い、65 °C で 15 分間、2 回洗浄することで行い、その他の操作、条件およびハイブリダイズした DNA の検出は、上記した DIG - ハイプライム DNA ラベリング & デテクション スターターキット I に添付されている説明書に準じて行った。

その結果、HindIII および PstI の完全消化断片の 3.5 kb p 付近に発色が見られた。

次に、NRRL B - 12025 株の染色体 DNA を HindIII および PstI を用いてそれぞれ完全消化し、アガロースゲル電気泳動により DNA 断片を分離した。それぞれの制限酵素消化 DNA から 3 - 4 kb p の断片をジーンクリーン II キットを用いて精製し、ライゲーションキットを用いて自己環化させた。

上記で決定した 0.8 kb の DNA 断片の塩基配列に基づき、配列番号 29 および 30 で表される塩基配列を設計、合成し、上記で取得した環化 DNA を鋳型として PCR を行った。PCR は、10 ng の環化 DNA、0.5 µmol/L の各プライマー、2.5 u

10

20

30

40

50

n i t sのp y r o b e s tポリメラーゼ（宝酒造社製）、5 μ Lのp y r o b e s tポリメラーゼ用×10緩衝液（宝酒造社製）、200 μ m o l / Lの各d N T Pを含む反応液50 μ Lを調製し、98 で5秒間、55 で30秒間、72 で3分30秒間の工程を30回繰り返すことにより行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、約3.0 kbの断片が増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20 μ LのTEに溶解した。

上記で得られたDNA断片とZero Blunt PCR Cloning Kit（インビトロジェン社製）とをライゲーションキットを用いて連結した。

該反応液を用いてエシェリヒア・コリNM522株をカルシウムイオンを用いる方法によって形質転換し、該形質転換体を50 μ g / m lのアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布した後、30 で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてその構造を解析することにより、y w f E遺伝子に相当する遺伝子を含むプラスミドであるp Y W F E 10（NRRL B - 12025株由来、配列番号16で表される塩基配列を有するDNA）が得られていることを確認した。

上記で得られたp Y W F E 1～p Y W F E 10に含まれるy w f Eに相当する各遺伝子の塩基配列を塩基配列分析装置373A・DNAシーケンサーを用いて決定した。

p Y W F E 1、p Y W F E 6およびp Y W F E 7に含まれる遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列は、y w f E遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列と同一であったが、p Y W F E 2、p Y W F E 3、p Y W F E 4、p Y W F E 5、p Y W F E 8、p Y W F E 9およびp Y W F E 10に含まれる遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列は、y w f E遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列と異なっていた。

p Y W F E 2、p Y W F E 3、p Y W F E 4、p Y W F E 5、p Y W F E 8、p Y W F E 9、p Y W F E 10およびp Y W F E 1とp Y W F E 7に含まれるy w f Eに相当する遺伝子にコードされる蛋白質のアミノ酸配列を配列番号2～8および1に、該遺伝子の塩基配列を配列番号10～16および36にそれぞれ示した。

実施例9 C末端Hisタグ付加型組換え型ジペプチド合成酵素の精製

バチルス・サチルスATCC15245、ATCC6633、IAM1213、IAM1107、IAM1214、ATCC9466、IAM1033、ATCC21555、またはバチルス・アミノリケファシエンスIFO3022の染色体DNAを鋳型とし、実施例2記載のプライマーAおよびプライマーBをプライマーセットとして用いてPCRを行った。PCRは、0.1 μ gの染色体DNA、0.5 μ m o l / Lの各プライマー、2.5 u n i t sのP f u DNAポリメラーゼ、4 μ LのP f u DNAポリメラーゼ用×10緩衝液、200 μ m o l / Lの各d N T Pを含む反応液40 μ Lを調製し、94 で1分間、55 で2分間、72 で3分間の工程を30回繰り返すことにより行った。

バチルス・プミルスNRRL B - 12025の染色体DNAを鋳型とした場合は、配列番号31および32で表される塩基配列を有するDNAをプライマーセットとして用い、上記と同様の条件でPCRを行った。

該反応液の1/10量をアガロースゲル電気泳動し、y w f E断片に相当する約1.4 kbのDNA断片がそれぞれ増幅していることを確認後、残りの反応液と等量のTE飽和フェノール/クロロホルム溶液を添加し、混合した。該混合液を遠心分離して得られた上層に、2倍容量の冷エタノールを加えて混合し、-80 に30分間放置した。該溶液を遠心分離して得られたDNAの沈殿を20 μ LのTEに溶解した。

該溶解液のそれぞれ5 μ Lを用い、増幅したDNAを制限酵素N c o IおよびB a m H Iで切断し、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離した後、ジーンクリーンI Iキットを用いて、y w f Eに相当する遺伝子を含む1.4 kbのDNA断片を回収した。

。

10

20

30

40

50

次にC末端Hisタグ付加型組換え体発現ベクターpQE60 0.2 μgを制限酵素NcoIおよびBamHIで切断後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、上記と同様の方法により3.4 kbのDNA断片を回収した。

上記で得られたパチルス・サチルス168株のywfeに相当する遺伝子を含む1.4 kbのDNA断片、および3.4 kbのDNA断片をライゲーションキットを用いて、16で16時間反応を行いそれぞれ連結した。

該反応液を用いて大腸菌NM522株をカルシウムイオンを用いる方法により形質転換し、該形質転換体を50 μg/mlのアンプシリンを含むLB寒天培地に塗布した後、30で一晩培養した。

生育してきた形質転換体のコロニーより公知の方法に従ってプラスミドを抽出し、制限酵素を用いてそれらの構造を解析することにより、C末Hisタグ付加型遺伝子発現ベクターであるpQE60ywfe1(ATCC15245由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe2(ATCC6633由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe3(IAM1213由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe4(IAM1107由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe5(IAM1214由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe6(ATCC9466由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe7(IAM1033由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe8(ATCC21555由来の遺伝子を含有するベクター)、pQE60ywfe9(IFO3022由来の遺伝子を含有するベクター)、およびpQE60ywfe10(NRRLB-12025由来の遺伝子を含有するベクター)が取得されていることを確認した。

上記で得られたエシェリヒア・コリNM522/pQE60ywfe1~NM522/pQE60ywfe10株を、それぞれ50 μg/mlのアンプシリンを含む8 mlのLB培地の入った太型試験管に接種し、28で17時間培養した。該培養液を50 μg/mlのアンプシリンを含む50 mlのLB培地の入った250 ml容の三角フラスコに接種し30で3時間培養した後、終濃度が1 mmol/Lになるようにイソプロピル-D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに30で4時間培養した。該培養液を遠心分離して得られた湿菌体から、HisTrapをその使用説明書に従って用いて、Hisタグ付加組換え型酵素を精製した。

実施例10 精製酵素を用いたジペプチドの生産

実施例9で得られた組換え型酵素0.04 mg、100 mmol/LのTris-HCl(pH8.0)、60 mmol/Lの塩化マグネシウム、60 mmol/LのATP、30 mmol/LのL-Alaおよび30 mmol/LのL-Glnからなる0.1 mlの反応液を調製し、37で16時間反応を行った。

反応終了後、実施例3記載の方法により反応液を分析した結果、それぞれ、3.0~3.5 g/LのL-Ala-L-Glnおよび0.25~0.3 g/LのL-Ala-L-Alaが生成蓄積していることが確認された。

また、上記反応液組成からATPを除くとL-Ala-L-GlnおよびL-Ala-L-Alaは全く生成されなかった。

以上の結果から、実施例8で得られた遺伝子の産物は、いずれもATP存在下でL-AlaとL-GlnとからL-Ala-L-GlnおよびL-Ala-L-Alaを生成する活性を有することが明らかになった。

【産業上の利用可能性】

本発明により、酵素的合成法が知られていなかったL-Ala-L-Ala以外のジペプチドを合成する活性を有する蛋白質を製造することができ、該蛋白質または該蛋白質を生産する能力を有する形質転換体もしくは微生物を用いてL-Ala-L-Ala以外のジペプチドを製造することができる。

【配列表フリーテキスト】

配列番号19 - 人工配列の説明：合成DNA

配列番号20 - 人工配列の説明：合成DNA

10

20

30

40

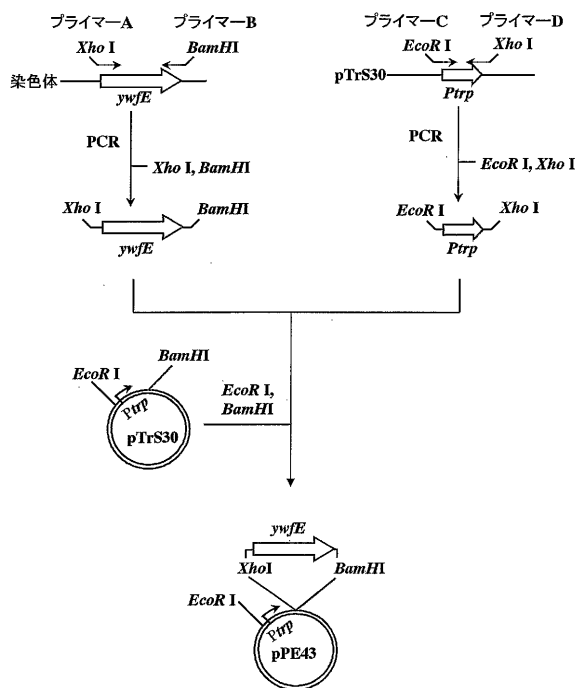
50

配列番号 2 1 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 2 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 3 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 4 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 5 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 6 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 7 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 8 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 2 9 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 3 0 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 3 1 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 3 2 - 人工配列の説明：合成 DNA
 配列番号 3 3 - 人工配列の説明：データベースサーチに用いたアミノ酸配列
 配列番号 3 4 - 人工配列の説明：データベースサーチに用いたアミノ酸配列
 配列番号 3 5 - 人工配列の説明：データベースサーチに用いたアミノ酸配列

10

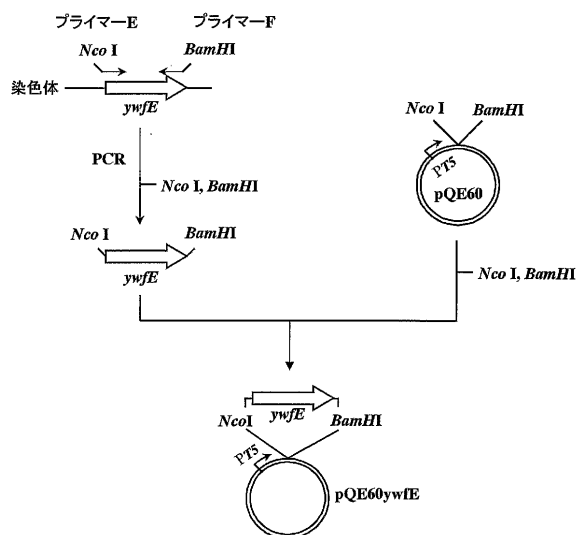
【図 1】

第1図



【図 2】

第2図



【配列表】

0004447467000001.xml

 フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
C 1 2 R	1/185 (2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
		C 1 2 R 1:07
		C 1 2 P 21/02 C
		C 1 2 R 1:185

審査官 滝口 尚良

(56)参考文献 Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], 2 0 0 2 年 8 月 5 日, Accessin No. P39641, U R L , <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=732373>
NATURE, Vol.390, (1997), p.249-256, 1 9 9 7 年, Vol.390, p.249-256

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

C12N 15/09
C12N 1/21
C12N 9/00
C12P 21/02
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
MEDLINE(STN)
BIOSIS/WPI(DIALOG)