

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2001 年 10 月 18 日 (18.10.2001)

PCT

(10) 国際公開番号  
**WO 01/77314 A1**

- (51) 国際特許分類: **C12N 15/09**, 15/31, 15/54, 1/21, 9/10, C12P 19/26 千 194-8533 東京都町田市旭町3丁目6番6号 協和醗酵工業株式会社 東京研究所内 Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/03110 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2001 年 4 月 11 日 (11.04.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願2000-109149 2000 年 4 月 11 日 (11.04.2000) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.) [JP/JP]; 千 100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番 1号 Tokyo (JP). 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 遠藤徹夫 (ENDO, Tetsuo) [JP/JP]. 小泉聡司 (KOIZUMI, Satoshi) [JP/JP]; 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MODIFIED  $\alpha$ 2,3-SIALYLTRANSFERASE GENE AND PROCESS FOR PRODUCING  $\alpha$ 2,3-SIALYLTRANSFERASE AND COMPLEX SACCHARIDE CONTAINING SIALIC ACID

(54) 発明の名称: 改変された  $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子および  $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素とシアル酸含有複合糖質の製造法

(57) Abstract: By using a microorganism having a gene obtained by modifying the base sequence of  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase gene originating in a microorganism belonging to the genus *Haemophilus*,  $\alpha$ 2,3-sialyltransferase can be produced in a large amount. Moreover, a complex saccharide containing sialic acid can be economically produced in a large amount by bringing a microorganism producing the above-described enzyme with CMP-NeuAc and a receptor complex saccharide in an aqueous medium.

(57) 要約:

本発明によれば、ヘモフィラス属に属する微生物由来の  $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素遺伝子の塩基配列を改変して得られる遺伝子を有する微生物を用いて  $\alpha$ 2,3-シアル酸転移酵素を大量に生産することができる。また、該酵素を生産する微生物、CMP-NeuAc および受容体複合糖質を水性溶媒中で接触させることによりシアル酸含有複合糖質を安価にしかも大量に生産することができる。

WO 01/77314 A1

## 明 細 書

改変された $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子および $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素とシアル酸含有複合糖質の製造法

### 技術分野

本発明は、改変された $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子、該遺伝子を用いた $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素およびシアル酸含有複合糖質の製造法に関する。

### 背景技術

$\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子に関しては、動物由来の遺伝子〔J. Biol. Chem., 267, 21011 (1992)、J. Biol. Chem., 268, 22782 (1993)、Eur. J. Biochem., 216, 377 (1993)、Biochem. Biophys. Res. Commun., 194, 375 (1993)、J. Biol. Chem., 269, 1394 (1994)、J. Biol. Chem., 269, 10028 (1994)、Glycobiology, 5, 319 (1995)〕が取得されている。該酵素遺伝子をエシェリヒア・コリなどの微生物で活性のある蛋白質として発現させた報告はあるが（特開平11-253163）、その活性は微弱である。

一方、微生物においては、ナイセリア属およびキャンピロバクター属に属する微生物から $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子が取得されている(W097/47749, W099/49051)。また、ヘモフィラス・デュークレイにおいても、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子の存在および活性検出の報告があるが〔J. Biol. Chem., 275, 4747 (1999)〕、該遺伝子をエシェリヒア・コリなどの微生物で発現させたという例はない。

シアル酸含有複合糖質は、細胞接着や細胞のガン化に関連していることが知られており〔Essentials of Glycobiology, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999)〕、ガンワクチンや再貫流障害などの医薬品としての応用が期待される。また人乳中に多く含まれているシアル酸を含有するオリゴ糖は、インフルエンザウイルスの受容体として機能していることが知られていることから〔

Virology, 232, 19 (1997))、安全な感染予防薬の有力な候補と考えられる。

しかしながら、シアル酸含有複合糖質の製造に関しては、人乳からの抽出法〔Anal. Biochem., 85, 602 (1978)〕、化学合成法〔Tetrahedron, 54, 6341 (1998)〕、酵素を用いた方法〔J. Am. Chem. Soc., 114, 9283 (1992), W094/25614〕が報告されているが、いずれもコスト面や生産性の面で問題があり、工業的な製造法は未だ確立されていない。

### 発明の開示

本発明は、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素およびシアル酸含有複合糖質の工業的製造法を提供することを課題とする。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意研究を行い、これまでエシェリヒア・コリ等の微生物では活性のある蛋白質として大量発現させた例のなかった $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素を、該酵素をコードするDNAの塩基配列を改変することにより、エシェリヒア・コリを用いて大量生産することに成功し、該酵素を用いたシアル酸含有複合糖質の工業的製法を確立し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は以下の(1)～(20)に関する。

(1) ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を発現する形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源に用い、該酵素源、受容体複合糖質およびシチジンーリン酸 N-アセチルノイラミン酸 (以下、CMP-NeuAcと略す) を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でシアル酸を $\alpha 2, 3$ 結合で受容体複合糖質に転移させることによりシアル酸含有複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からシアル酸含有複合糖質を採取することを特徴とするシアル酸含有複合糖質の製造法。

(2) ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を発現する形質転換体を培地に培養し、培養物中に $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質

を採取することを特徴とする、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質の製造法。

(3) 形質転換体が、微生物に組換え体DNAを導入して得られる形質転換体である(1)または(2)に記載の製造法。

(4) 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である(3)に記載の製造法。

(5) エシェリヒア属に属する微生物が、エシェリヒア・コリである(4)に記載の製造法。

(6) 組換え体DNAが、ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを含有する組換え体DNAである(3)に記載の製造法。

(7) ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAが、以下の[1]～[3]のいずれか1つから選ばれるDNAである(6)に記載の製造法。

[1]ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAにおいて、1つ以上のコドン、該DNAを発現させる宿主細胞において使用頻度が高いコドンに改変して得られる塩基配列を有するDNA

[2]配列番号1で表される塩基配列を有するDNA

[3]配列番号1で表される塩基配列からなるDNAにおいて1以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するDNAであり、かつ $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA

(8) ヘモフィラス属に属する微生物が、ヘモフィラス・デュークレイであることを特徴とする、(1)、(2)、(6)または(7)に記載の製造法。

(9) 受容体複合糖質が、非還元末端にガラクトースを有する10糖以下のオリゴ糖を含む複合糖質である(1)に記載のシアル酸含有複合糖質の製造法。

(10) オリゴ糖が、非還元末端にラクトース、N-アセチルラクトサミン、

ラクトーN-テトラオース、ラクトーN-ネオテトラオース、ルイスX、またはルイスa構造を有するオリゴ糖である（9）に記載のシアル酸含有複合糖質の製造法。

（11）培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液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（1）に記載のシアル酸含有複合糖質の製造法。

（12）ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAにおいて、1つ以上のコドン、該DNAを発現させる宿主細胞において使用頻度が高いコドンに改変して得られる塩基配列を有するDNA。

（13）ヘモフィラス属に属する微生物が、ヘモフィラス・デュークレイである（12）に記載のDNA。

（14）配列番号1で表される塩基配列を有するDNA。

（15）配列番号1で表される塩基配列からなるDNAにおいて1以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有するDNAであり、かつ $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA。

（16）（12）～（15）のいずれか1つに記載のDNAをベクターに連結して得られる組換え体DNA。

（17）（16）に記載の組換え体DNAを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

（18）宿主細胞が、微生物である（17）に記載の形質転換体。

（19）微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である（18）に記載の形質転換体。

(20) エシェリヒア属に属する微生物が、エシェリヒア・コリである(19)に記載の形質転換体。

本発明のDNAは、ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを改変したDNAであり、例えば、ヘモフィラス・デュークレイ由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAにおいて、1つ以上のコドンで、該DNAを発現させる宿主生物において使用頻度が高いコドンに改変して得られる塩基配列を有するDNA、および該塩基配列からなるDNAの塩基のうち1個以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなり、かつ $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAなどがあげられる。

上記の宿主生物としては本発明のDNAを発現させることが可能なものであれば特に限定されず、生物個体、生物の組織、生物の培養細胞、微生物菌体などを宿主生物として用いることができる。宿主生物として、好ましくは微生物、より好ましくはエシェリヒア属に属する微生物、特に好ましくはエシェリヒア・コリを例示することができる。使用頻度が高いコドンとは、該宿主細胞において各アミノ酸に対応するコドンの使用頻度が少なくとも10%以上であるコドンであり、好ましくは15%以上、より好ましくは20%以上であるコドンがあげられる。

また上記の1個以上の塩基が欠失、置換若しくは付加したDNA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)あるいは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)等に記載の部位特異的変異導入法を用いることで取得可能である。該変異導入DNAにコードされる蛋白質に生じるアミノ酸の欠失、置換若

しくは付加される数は特に限定されないが、例えば1個から20個、好ましくは1個から15個、より好ましくは1個から5個があげられる。

また、本発明のDNAが $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするには、該変異導入DNAが配列番号2記載のアミノ酸配列と少なくともBLAST〔J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)〕やFASTA〔Methods in Enzymology, 183, 63-98 (1990)〕等を用いて計算したときに、少なくとも60%以上、通常は80%以上、特に95%以上の相同性を有していることが好ましい。

本発明のDNAの作製方法としては、ヘモフィラス・デュークレイ由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを用いて、例えば、モレキュラー・クローニング第2版、カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、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)等に記載の部位特異的変異導入法を用いて調製する方法をあげることができる。また合成DNAを用いた方法としては、例えば

(1) 常法〔PCR Protocols, Humana Press (1993)等〕に従ってPCRにより、人工的にDNAを合成する方法、

(2) 目的とするDNAの全長をカバーするように100bp程度の合成DNAをセンス鎖、アンチセンス鎖とも作製し、アニーリング後、DNAリガーゼで連結する方法、をあげることができる。

本発明のDNAを用いて $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を製造する方法としては、例えば上記方法により作製した該蛋白質をコードするDNAをモレキュラー・クローニング第2版記載の方法に従ってベクターDNAと連結することで組換え体DNAを作製し、モレキュラー・クローニング第2版記載の方法に従って、該組換え体DNAを用いて宿主生物を形質転換し、

得られた形質転換体を該形質転換体が生育し得る適当な培地中で培養し、該培養液中に該蛋白質を蓄積させ、該培養液から該蛋白質を得る方法があげられる。また該培養液から該蛋白質を採取するには、該蛋白質を可溶化後、イオン交換、ゲルろ過あるいは疎水性クロマトグラフィー法等、または該クロマトグラフィー法を組み合わせることにより単離精製する方法があげられる。

本発明のシアル酸含有複合糖質は、該蛋白質を生産する形質転換体の培養液や培養液の処理物、あるいは精製した該蛋白質を酵素源に用い、受容体複合糖質、CMP-NeuAcを水性溶媒中で共存させることにより得ることができる。

受容体複合糖質は、本発明のDNAがコードする $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質の基質になるものであれば特に限定されないが、好ましくは非還元末端にガラクトースを有する糖があげられ、より好ましい基質としては非還元末端にラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ルイスX、またはルイスa構造を有する糖をあげることができる。

生成したシアル酸含有複合糖質は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常のクロマトグラフィー法によって取得することができる。

以下、本発明を詳細に説明する。

[1]  $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を生産する形質転換体の作製

#### (1) 本発明のDNAの作製

本発明のDNAは、以下に示す方法で作製することができる。まず、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素のアミノ酸配列を選択する。該酵素のアミノ酸配列としては、該酵素活性を有するアミノ酸配列であればいかなるものでも用いることができるが、例えば、配列番号2で表されるGenebank等のデータベースに登録されているヘモフィラス・デュークレイ由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素の

アミノ酸配列等があげられる。次に、該酵素活性を発現させる宿主細胞において使用頻度の高いコドンを用いて該酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを設計する。

例えば宿主細胞にエシェリヒア・コリを用いる場合は、選択した該酵素のアミノ酸配列をエシェリヒア・コリの遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度[Codon Usage database at kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)]を考慮して、最も使用頻度の高いコドンをもつようにDNA配列に変換することで本発明のDNAを設計できる。

上記のように設計したDNAとしては、例えばヘモフィラス・デュークレイ由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子を基に設計した配列番号1記載の塩基配列を有するDNAをあげることができる。

次に、設計した塩基配列に基づき、隣り合う合成DNAが互いに10～100塩基の重複配列を有し、かつそれらがセンス鎖、アンチセンス鎖と交互になるように、5'末端側から40～150塩基の長さから成る合成DNAを自動DNA合成機（パーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置）を用いて合成する。このような合成DNAとして、例えば配列番号1に記載の塩基配列からなるDNAを基に設計した配列番号3～16に記載の塩基配列を有するDNAをあげることができる。上記の合成DNAを用いて常法〔例えば、PCR Protocols, Humana Press (1993)等〕に従ってPCRにより、本発明のDNAを人工的に合成する。PCRの条件は、該合成DNAを用いてPCR反応をした際、該合成DNAの設計の基となった本発明のDNAと同一の長さの増幅DNA断片を与えるような条件であれば限定されないが、例えば配列番号3～16に記載の塩基配列を有するDNAを用いた場合、94℃で30秒間、50℃で30秒間、74℃で60秒間を1サイクルとするサイクルを30サイクル行う条件をあげることができる。

また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を

導入することで、本発明のDNAをベクターに容易にクローニングすることも可能である。このような合成DNAとして、例えば上記配列番号3～16に記載の塩基配列を有するDNAを用いたPCRの際に使用できる、配列番号17および配列番号18に記載の塩基配列を有するDNAのプライマーセットをあげることができる。

## (2) 本発明のDNAのクローン化と塩基配列の確認

上記(1)で調製した本発明のDNAをそのまま、あるいは適当な制限酵素などで切断後、常法によりベクターに連結する。

該DNAを連結するベクターとしては、エシェリヒア・コリK12株中で自立複製可能なベクターであればファージベクター、プラスミドベクター等いずれも使用可能であるが、具体的には、ZAP Express〔Stratagene社製、Strategies, 5, 58 (1992)〕、pBluescript II SK(+)〔Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)〕、λzap II (Stratagene社製)、λgt10、λgt11〔DNA Cloning, A Practical Approach, 1, 49 (1985)〕、λTriplEx (クローンテック社製)、λBlueMid (クローンテック社製)、λExCell (ファルマシア社製)、pT7T318U (ファルマシア社製)、pcD2〔Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)〕、pUC18〔Gene, 33, 103 (1985)〕等をあげることができる。

該ベクターに(1)で取得した本発明のDNAを連結して得られる組換え体DNAの宿主に用いるエシェリヒア・コリは、エシェリヒア・コリに属する微生物であればいずれでも用いることができるが、具体的には、Escherichia coli XL1-Blue MRF'〔Stratagene社製、Strategies, 5, 81 (1992)〕、Escherichia coli C600〔Genetics, 39, 440 (1954)〕、Escherichia coli Y1088〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli Y1090〔Science, 222, 778 (1983)〕、Escherichia coli NM522〔J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)〕、Escherichia coli K802〔J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)〕、Escherichia coli JM105〔Gene, 38, 275 (1985)〕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 Research, 16, 6127 (1988)〕等をあげることができる。

上記のようにして得られた形質転換体から組換え体DNAを抽出し、該組換えDNAに含まれる本発明のDNAの塩基配列を決定することができる。塩基配列の決定には、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)〕または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ることができる。このようにして（1）で取得した本発明のDNAが、該DNAを合成する基として設計したDNAと同一の塩基配列からなるDNAであることを確認することができる。

上記のようにして取得した組換え体DNAを保有する形質転換株として、例えば配列番号1で表される塩基配列を有するプラスミドDNAを保有する大腸菌、Escherichia coli NM522/pHE5をあげることができる。

〔2〕 本発明のDNAを用いた $\alpha 2$ , 3-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質の調製

本発明のDNAがコードする $\alpha 2$ , 3-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は、モレキュラー・クローニング第2版やカレント・プロトコルズ・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、本発明のDNAを宿主細胞中で発現させて、製造することができる。

即ち、本発明のDNAを基にして、必要に応じて該蛋白質をコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を調製し、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した組換え体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して形質転換株を取得し、該

形質転換株を培地中で培養し、該培養液に $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を蓄積せしめることにより製造できる。

宿主細胞としては、細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞、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しは染色体DNA中への組込が可能で、本発明の蛋白質をコードする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、本発明の蛋白質をコードするDNAを含有してなる組換え体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、転写終結配列、より構成されたベクター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。

発現ベクターとしては、例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2 (いずれもベリンガーマンハイム社より市販)、pKK233-2 (Pharmacia社製)、pSE280 (Invitrogen社製)、pGEMEX-1 (Promega社製)、pQE-8 (QIAGEN社製)、pKYP10 (特開昭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(-) (Stratagene社製)、pTrS30 [Escherichia coli JM109/pTrS30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrS32 [Escherichia coli JM109/pTrS32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [Escherichia coli IGHA2 (FERM B-400) より調製、特開昭60-221091]、pGKA2 [Escherichia coli IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、特開昭60-221091]、pPAC31 (W098/12343)、pTerm2 (US4686191、US4939094、US5160735)、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX (Pharmacia社製)、pETシステム (Novagen社製) 等をあげることができる。

プロモーターとしては、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、 $P_L$ プロモーター、 $P_R$ プロモーター、T7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 ( $P_{trp} \times 2$ )、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。

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。

本発明の組換え体DNAにおいては、本発明のDNAの発現に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。

宿主細胞としては、エシェリヒア属、セラチア属、バチルス属、ブレヴィバクテリウム属、コリネバクテリウム属、ミクロバクテリウム属、シュードモナス属等に属する微生物、例えば、Escherichia coli XL1-Blue、Escherichia coli XL2-Blue、Escherichia coli DH1、Escherichia coli MC1000、Escherichia coli KY3276、Escherichia coli W1485、Escherichia coli JM109、Escherichia coli HB101、Escherichia coli No.49、Escherichia coli W3110、Escherichia coli NY49、Escherichia coli GI698、Escherichia coli TB1、Serratia ficaria、Serratia fonticola、Serratia liquefaciens、Serratia marcescens、Bacillus subtilis、Bacillus amyloliquefaciens、Corynebacterium ammoniagenes、Brevibacterium immariophilum ATCC14068、Brevibacterium saccharolyticum ATCC14066、Brevibacterium flavum ATCC14067、Brevibacterium lactofermentum ATCC13869、Corynebacterium glutamicum ATCC13032、Corynebacterium glutamicum ATCC13869、Corynebacterium acetoacidophilum ATCC13870、Microbacterium ammoniophilum ATCC15354、Pseudomonas putida、Pseudomonas sp. D-0110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）、またはGene, 17, 107 (1982)やMol. Gen. Genet., 168, 111 (1979)に記載の方法等をあげることができる。

酵母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 (ATCC37115)、YEp24 (ATCC37051)、YCp50 (ATCC37419)、pHS19、pHS15等をあげることができる。

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、ヘキソースキナーゼ等の解糖系の遺伝子のプロモーター、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 $\alpha$ 1プロモーター、CUP 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、Saccharomyces属、Schizosaccharomyces属、Kluyveromyces属、Trichosporon属、Schwanniomyces属、Pichia属、Candida属等に属する微生物、例えば、Saccharomyces cerevisiae、Schizosaccharomyces pombe、Kluyveromyces lactis、Trichosporon pullulans、Schwanniomyces alluvius、Candida utilis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、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, 75, 1929 (1978)〕、酢酸リチウム法〔J. Bacteriol., 153, 163 (1983)〕、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 1929 (1978)記載の方法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、pcDNA1

、pcDM8 (フナコシ社製)、pAGE107〔特開平3-22979、Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、pAS3-3 (特開平2-227075)、pCDM8〔Nature, 329, 840 (1987)〕、pcDNA1/Amp (Invitrogen社製)、pREP4 (Invitrogen社製)、pAGE103〔J. Biochem., 101, 1307 (1987)〕、pAGE210等をあげることができる。

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 (CMV) のIE (immediate early) 遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモーター、ヒートショックプロモーター、SR $\alpha$ プロモーター等をあげることができる。また、ヒトCMVのIE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。

宿主細胞としては、ヒトの細胞であるナマルバ (Namalwa) 細胞、サルの細胞であるCOS細胞、チャイニーズ・ハムスターの細胞であるCHO細胞、HBT5637 (特開昭63-299) 等をあげることができる。

動物細胞への組換え体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〔Cytotechnology, 3, 133 (1990)〕、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)〕、Virology, 52, 456 (1973)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、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company (1992)、Bio/Technology, 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。

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、pVL1392、

pVL1393、pBlueBacIII（ともにInvitrogen社製）等をあげることができる。

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 (Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。

昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるSf9、Sf21〔Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual, W. H. Freeman and Company (1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるHigh 5 (Invitrogen社製) 等を用いることができる。

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。

組換え体DNA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) (特開昭59-140885、特開昭60-70080、W094/00977)、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。

以上のようにして得られる本発明の形質転換体を培地に培養し、培養物中に $\alpha$  2, 3-シアル酸転移酵素活性を有する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。

本発明の形質転換体が大腸菌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である場合、該形質転換体を培養する培地として、該形質転換体が資化し得る炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、該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。

炭素源としては、該形質転換体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、プロパノールなど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、ならびに、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。

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、振盪培養または深部通気攪拌培養など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16時間～7日間である。培養中のpHは3.0～9.0に保持することが好ましい。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、アンモニアなどを用い

て行う。

また、培養中必要に応じて、アンピシリン、テトラサイクリンやクロラムフェニコール等の抗生物質を培地に添加してもよい。

プロモーターとして誘導性のプロモーターを用いた組換え体DNA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、lacプロモーターを用いた組換え体DNA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ーβ-D-チオガラクトピラノシド等を、trpプロモーターを用いた組換え体DNA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RPMI1640培地〔J. Am. Med. Assoc., 199, 519 (1967)〕、EagleのMEM培地〔Science, 122, 501 (1952)〕、ダルベッコ改変MEM培地〔Virology, 8, 396 (1959)〕、199培地〔Proc. Soc. Biol. Med., 73, 1 (1950)〕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、30～40℃、5%CO<sub>2</sub>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 (Pharmingen社製)、Sf-900 II SFM培地 (Life Technologies社製)、ExCell400、ExCell405 (いずれもJRH Biosciences社製)、Grace's Insect Medium〔Nature, 195, 788 (1962)〕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、ホワイト(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、培養中に必要に応じて、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、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを組み込んだ組換え体DNAを保有する微生物、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、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ことにより、該蛋白質を製造することができる。

$\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する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等があり、使用する宿主細胞や、生産させる蛋白質の構造を変えることにより、該方法を選択することができる。

$\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する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. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)〕、ロウらの方法〔Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)〕、または特開平5-336963、W0 94/23021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、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質の活性部位を含むポリペプチド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 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を製造することもできる。

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 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する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該蛋白質を生産する方法があげられる。

動物個体の場合は、例えば、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを導入したトランスジェニック非ヒト動物を飼育し、該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。該動物中の生成・蓄積場所としては、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 $\alpha$ カゼインプロモーター、 $\beta$ カゼインプロモーター、 $\beta$ 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。

植物個体を用いて $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を製造する方法としては、例えば該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。

本発明の形質転換体により製造された蛋白質を単離精製するためには、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発現した場合には、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、超音波破碎機、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碎し、無細胞抽出液を得る。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) ーセファロース、DIAION HPA-75 (三菱化成社製) 等の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 (Pharmacia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。

また、該蛋白質が細胞内に不溶体を形成した場合は、同様に細胞を回収後、破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として蛋白質の不溶体を回収する。回収した蛋白質の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析し、該可溶化液中の蛋白質変性剤の濃度を下げることにより、該蛋白質を正常な立体構造に戻す。該操作の後、上記と同様の単離精製法により該蛋白質の精製標品を得ることができる。

上記方法により製造される蛋白質、あるいは該蛋白質に糖鎖の付加された蛋白質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あるいは

該蛋白質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培養上清を取得し、該培養上清から、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2記載のアミノ酸配列を有する蛋白質をあげることができる。

また、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質は、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っても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。

### [3] シアル酸含有複合糖質の調製

上記[2]記載の培養により得られた形質転換体の培養液および該培養液を種々処理した培養液の処理物を酵素源として用い、水性媒体中でシアル酸含有複合糖質を製造することができる。

培養液の処理物としては、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液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。

シアル酸含有複合糖質の生成において用いられる酵素源は、37℃で1分間に1 $\mu$ モルのシアル酸含有複合糖質を生成することのできる活性を1単位(U)として、0.1mU/L~10,000U/Lであり、好ましくは1mU/L~1,000U/Lの濃度で用いる。

シアル酸含有複合糖質の生成において用いられる水性媒体としては、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、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などをあげることができる。また、酵素源として用いた微生物の培養液を水性媒体として用いることができる。

シアル酸含有複合糖質の生成において、必要に応じて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（例えばナイミーン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、シアル酸含有複合糖質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0.1~50 g/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、酢酸エチルなどが挙げられ、通常 0.1~50 ml/Lの濃度で用いられる。

シアル酸含有複合糖質の生成において用いられる糖ヌクレオチド基質であるCMP-NeuAcとしては、市販品の他、微生物等の活性を利用して生成した反応液あるいは該反応液から精製したものをを用いることができる。

該糖ヌクレオチド基質は0.1~500 mmol/Lの濃度で用いる。

シアル酸含有複合糖質の生成において用いられる受容体複合糖質としては、糖転移酵素の基質となるものであればいずれも用いることができ、例えば、ラクトース、N-アセチルラクトサミンの他、非還元末端にガラクトース、ラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクトーN-テトラオース、ラクトーN-ネオテトラオース、ルイスX、またはルイスa構造を有する10糖以下のオリゴ糖などを例示することができる。

該受容体複合糖質は0.1～500mmol/Lの濃度で用いる。

該生成反応において、必要に応じてMnCl<sub>2</sub>等の無機塩、β-メルカプトエタノール等を添加することができる。

シアル酸含有複合糖質の生成反応は水性媒体中、pH5～10、好ましくはpH6～8、20～50℃の条件で1～96時間行う。

水性媒体中に生成したシアル酸含有複合糖質の定量は公知の方法に準じて行うことができる〔化学と工業、43, 953 (1990)〕。

反応液中に生成したシアル酸含有複合糖質の採取は、活性炭やイオン交換樹脂などを用いる通常の方法によって行うことができ、例えば、Anal. Biochem., 85, 602 (1978)記載の方法に準じて行うことができる。

#### 図面の簡単な説明

第1図 α2, 3-シアル酸転移酵素遺伝子発現プラスミドpHE5の構造を示す図である。

第1図で用いられる符号の意味を以下に説明する。

Amp<sup>r</sup> : アンピシリン耐性遺伝子

P<sub>trp</sub> : trpプロモーター

lst : α2, 3-シアル酸転移酵素遺伝子

#### 発明を実施するための最良の形態

以下に本発明の実施例を示すが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

##### 実施例1 α2, 3-シアル酸転移酵素発現株の造成

α2, 3-シアル酸転移酵素のアミノ酸配列として、配列番号2に記載のアミノ酸配列で表されるヘモフィラス・デュークレイ (*Haemophilus ducreyi*) のα2, 3-シアル酸転移酵素アミノ酸配列 (GenBank: AF101047) を選択し、大腸菌のコドンの使用頻度[Codon Usage database at kazusa (<http://www.kazusa.or.jp/codon/>)]を考慮して、使用頻度が最も高いコドンで

構成されるDNA配列に変換し、配列番号1に示す $\alpha 2$ , 3-シアル酸転移酵素をコードするDNA配列を設計した。設計した塩基配列に基づき、隣り合う合成DNAが互いに20塩基の重複配列を有し、かつ、それらがセンス鎖、アンチセンス鎖と交互になるように、配列番号3から配列番号16記載のDNAをパーセプティブ・バイオシステムズ社製8905型DNA合成装置を用いて合成した。また上記で設計した $\alpha 2$ , 3-シアル酸転移酵素をコードするDNAの両末端に、ベクターヘクローニングするための制限酵素認識配列を導入するために、配列番号17および18記載のDNAも同様に合成した。

各DNAを最終濃度が $0.02 \mu\text{mol/L}$ となる様に、 $16 \text{ mmol/L}$  硫酸アンモニウム、 $10 \text{ mmol/L}$  塩化カリウム、 $1 \text{ mmol/L}$  塩化マグネシウム、 $20 \text{ mmol/L}$  トリス-塩酸 (pH 8.0)、 $0.1\%$  Triton X-100、 $0.001\%$  BSA、 $200 \mu\text{mol/L}$  dNTPs、及び2.5単位のKOD DNA polymerase (東洋紡社製) よりなる緩衝液に加えて全量で $50 \mu\text{l}$ とし、 $50 \mu\text{l}$ の鉱油で覆い、DNAサーマルサイクラー (PJ480、PERKIN ELMER社製) にセットし、 $94^\circ\text{C}$ で30秒間、 $50^\circ\text{C}$ で30秒間、 $74^\circ\text{C}$ で60秒間を1サイクルとする反応を30サイクル行い、約 $0.9 \text{ kb}$ のPCR産物を取得した。

該PCR産物  $0.5 \mu\text{g}$ を制限酵素C1a IおよびBamH Iで切断後、制限酵素C1a IおよびBamH Iで切断したpTrS30 DNA  $0.2 \mu\text{g}$ と共にライゲーションキット (宝酒造社製) を用いて、 $16^\circ\text{C}$ で16時間、連結反応を行った。

該連結反応液を用いてEscherichia coli NM522株を前述の公知の方法に従って形質転換し、該形質転換体をアンピシリン  $50 \mu\text{g/ml}$ を含むLB寒天培地〔バクトトリプトン (ディフコ社製)  $10 \text{ g/L}$ 、酵母エキス (ディフコ社製)  $5 \text{ g/L}$ 、NaCl  $5 \text{ g/L}$  (pH 7.2)、寒天  $15 \text{ g/L}$ ] に塗布後、 $30^\circ\text{C}$ 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、常法に従ってプラスミドを抽出し、該プラスミドの構造を解析したところ、プラスミド pTrS30 の ClaI と BamHI 部位に 0.9 kb の全合成した DNA 断片が挿入した第 1 図に示すような構造を有していたことより、プラスミド pHE5 が得られたことを確認した。

また、該 0.9 kb 挿入断片の DNA 塩基配列を決定したところ、配列表の配列番号 1 に示すようなオープンリーディングフレーム (ORF) が見い出された。

以上のことより、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素遺伝子発現株である Escherichia coli NM522/pHE5 株が得られたことを確認した。

#### 実施例 2 3'-シアリルラクトースの生産

実施例 1 で得られた Escherichia coli NM522/pHE5 株をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 8 ml の入った太型試験管に接種し 28°C で 17 時間培養した。該培養液をアンピシリン 50  $\mu$ g/ml を含む LB 培地 8 ml の入った太型試験管に 1% 接種し 37°C で 5 時間培養した。該培養液 0.1 ml を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて -20°C で保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

該湿菌体 (0.1ml 分)、5.0 mmol/L クエン酸バッファー (pH 7.0)、1.0 mmol/L  $MnCl_2$ 、1.0 mmol/L lactose、1.0 mmol/L CMP-NeuAc、0.4% ナイミーン S-215 からなる 0.1 ml の反応液を調製し、37°C で 16 時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置 (DX-500) を用いて以下の分析条件で分析し、反応液中に 0.05 mmol/L (30 mg/L) の 3'-シアリルラクトースが生成蓄積していることを確認した。

#### 分析条件

カラム : CarboPAC PA10

溶離液 : A; H<sub>2</sub>O、B; 500 mmol/L NaOH、C; 100 mmol/L NaOH、500 mmol/L NaOAc

グラジエント：70% A、20%B、10%C—45%A、30%B、25%C in 15min

流量：1.0mL/min

検出器：パルスドアンペロメトリー検出器

### 実施例3 シアリルラクトーN-ネオテトラオースの生産

実施例1で得られた *Escherichia coli* NM522/pHE5株をアンピシリン 50  $\mu$ g/mLを含むLB培地 8 mLの入った太型試験管に接種し、28°Cで17時間培養した。

該培養液をアンピシリン 50  $\mu$ g/mLを含むLB培地 8 mLの入った太型試験管に1%接種し、37°Cで5時間培養した。

該培養液 0.1 mL分を遠心分離し湿菌体を取得した。該湿菌体は必要に応じて-20°Cで保存することが可能で、使用前に解凍して用いることができた。

該湿菌体 (0.1 mL分)、50 mmol/L クエン酸バッファー (pH 7.0)、10 mmol/L  $MnCl_2$ 、10 mmol/L CMP-NeuAc、0.4% ナイミーンS-215および10 mmol/L ラクトーN-ネオテトラオースを含む反応液 0.1 mLを調製し、37°Cで16時間反応を行った。

反応終了後、反応生成物をダイオネックス社製糖分析装置(DX-500)を用いて分析し(実施例2と同様)、反応液中に0.15 mmol/L (150 mg/L)のシアリルラクトーN-ネオテトラオースが生成蓄積していることを確認した。

### 産業上の利用可能性

本発明により、 $\alpha$ 2, 3-シアル酸転移酵素を遺伝子組換え手法により大量に生産することが可能となる。また、該酵素を用いることによりシアル酸含有複合糖質を効率的に製造できる。

### 「配列フリーテキスト」

配列番号1—人工配列の説明：合成DNA

配列番号3—人工配列の説明：合成DNA

配列番号 4 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 5 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 6 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 7 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 8 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 9 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 10 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 11 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 12 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 13 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 14 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 15 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 16 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 17 一人工配列の説明：合成DNA  
配列番号 18 一人工配列の説明：合成DNA

## 請求の範囲

1. ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を発現する形質転換体の培養液または該培養液の処理物を酵素源に用い、該酵素源、受容体複合糖質およびシチジノーリン酸 N-アセチルノイラミン酸（以下、CMP-NeuAcと略す）を水性媒体中に存在せしめ、該水性媒体中でシアル酸を $\alpha 2, 3$ 結合で受容体複合糖質に転移させることによりシアル酸含有複合糖質を生成蓄積させ、該水性媒体中からシアル酸含有複合糖質を採取することを特徴とするシアル酸含有複合糖質の製造法。

2. ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を発現する形質転換体を培地に培養し、培養物中に $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質を生成蓄積させ、該培養物から該蛋白質を採取することを特徴とする、 $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質の製造法。

3. 形質転換体が、微生物に組換え体DNAを導入して得られる形質転換体である、請求項1または2に記載の製造法。

4. 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である請求項3に記載の製造法。

5. エシェリヒア属に属する微生物が、エシェリヒア・コリである請求項4に記載の製造法。

6. 組換え体DNAが、ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAを含有する組換え体DNAである請求項3に記載の製造法。

7. ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAが、以下の(1)～(3)のいずれか1つから選ばれるDNAである請求項6に記載の製造法。

(1) ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性

を有する蛋白質をコードするDNAにおいて、1つ以上のコドン、を、該DNAを発現させる宿主細胞において使用頻度が高いコドンに改変して得られる塩基配列を有するDNA

(2) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNA

(3) 配列番号1で表される塩基配列を有するDNAにおいて1以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列からなるDNAであり、かつ $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNA

8. ヘモフィラス属に属する微生物が、ヘモフィラス・デュークレイである請求項1、2、6または7に記載の製造法。

9. 受容体複合糖質が、非還元末端にガラクトースを有する10糖以下のオリゴ糖を含む複合糖質である請求項1に記載のシアル酸含有複合糖質の製造法。

10. オリゴ糖が、非還元末端にラクトース、N-アセチルラクトサミン、ラクト-N-テトラオース、ラクト-N-ネオテトラオース、ルイスX、またはルイスa構造を有するオリゴ糖である請求項9に記載のシアル酸含有複合糖質の製造法。

11. 培養液の処理物が、培養液の濃縮物、培養液の乾燥物、培養液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請求項1に記載のシアル酸含有複合糖質の製造法。

12. ヘモフィラス属に属する微生物由来の $\alpha 2, 3$ -シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードするDNAにおいて、1つ以上のコドン、を、該DNAを発現させる宿主細胞において使用頻度が高いコドンに改変して得られる塩基配列を有するDNA。

13. ヘモフィラス属に属する微生物が、ヘモフィラス・デュークレイであ

ることを特徴とする、請求項 12 に記載の DNA。

14. 配列番号 1 で表される塩基配列を有する DNA。

15. 配列番号 1 で表される塩基配列からなる DNA において 1 以上の塩基が欠失、置換若しくは付加された塩基配列を有する DNA であり、かつ  $\alpha 2$ , 3-シアル酸転移酵素活性を有する蛋白質をコードする DNA。

16. 請求項 12 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の DNA をベクターに連結して得られる組換え体 DNA。

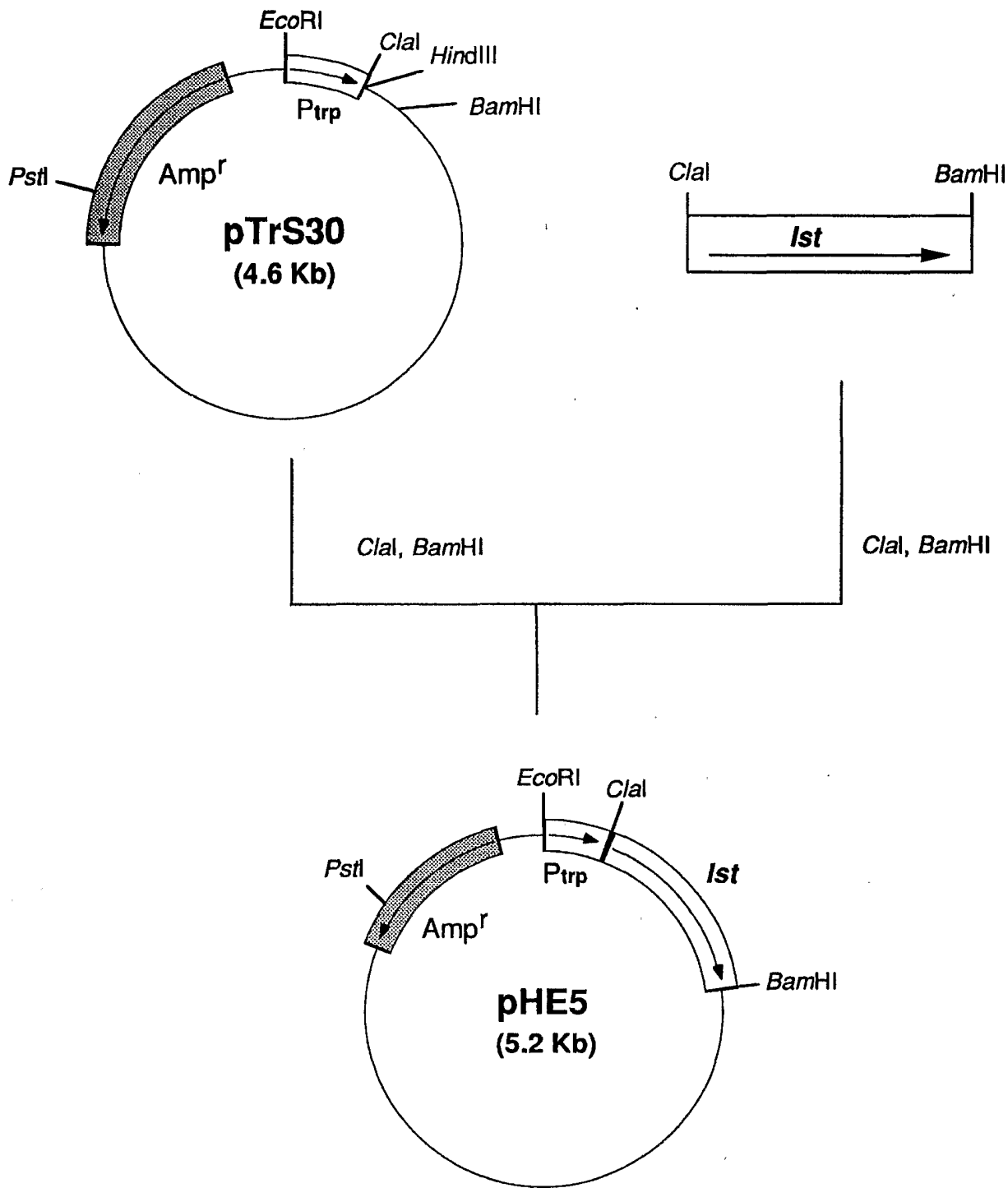
17. 請求項 16 に記載の組換え体 DNA を宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

18. 宿主細胞が、微生物である請求項 17 に記載の形質転換体。

19. 微生物が、エシェリヒア属に属する微生物である請求項 18 に記載の形質転換体。

20. エシェリヒア属に属する微生物が、エシェリヒア・コリである請求項 19 に記載の形質転換体。

第 1 図



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; KYOWA HAKKO KOGYO CO.,LTD

&lt;120&gt; Improved alpha 2,3-sialyltransferase gene and process for producing of alpha 2,3-sialyltransferase and complex carbohydrate containing sialic acid

&lt;130&gt; 11297W01

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;150&gt; JP 00/109149

&lt;151&gt; 2000-4-11

&lt;160&gt; 18

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 885

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artifitial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(885)

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| atg | aaa | gaa | att | gcg | att | att | agc | aac | cag | cgc | atg | ttt | ttt | ctg | tat | 48 |
| Met | Lys | Glu | Ile | Ala | Ile | Ile | Ser | Asn | Gln | Arg | Met | Phe | Phe | Leu | Tyr |    |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |    |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| tgc | ctg | ctg | acc | aac | aaa | aac | gtg | gaa | gat | gtg | ttt | ttt | att | ttt | gaa | 96 |
| Cys | Leu | Leu | Thr | Asn | Lys | Asn | Val | Glu | Asp | Val | Phe | Phe | Ile | Phe | Glu |    |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| aaa | ggc | gcg | atg | ccg | aac | aac | ctg | acc | agc | att | agc | cat | ttt | att | gtg | 144 |
| Lys | Gly | Ala | Met | Pro | Asn | Asn | Leu | Thr | Ser | Ile | Ser | His | Phe | Ile | Val |     |

| 35                                                              | 40  | 45  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| ctg gat cat agc aaa agc gaa tgc tat gat ttt ttt tta ttt aac ttt |     |     | 192 |
| Leu Asp His Ser Lys Ser Glu Cys Tyr Asp Phe Phe Tyr Phe Asn Phe |     |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |     |
| att agc tgc aaa tat cgc ctg cgc ggc ctg gat gtg tat ggc gcg gat |     |     | 240 |
| Ile Ser Cys Lys Tyr Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gly Ala Asp |     |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  | 80  |
| cat att aaa ggc gcg aaa ttt ttt ctg gaa cgc cat cgc ttt ttt gtg |     |     | 288 |
| His Ile Lys Gly Ala Lys Phe Phe Leu Glu Arg His Arg Phe Phe Val |     |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |     |
| gtg gaa gat ggc atg atg aac tat agc aaa aac atg tat gcg ttt agc |     |     | 336 |
| Val Glu Asp Gly Met Met Asn Tyr Ser Lys Asn Met Tyr Ala Phe Ser |     |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |     |
| ctg ttt cgc acc cgc aac ccg gtg att ctg ccg ggc ggc ttt cat ccg |     |     | 384 |
| Leu Phe Arg Thr Arg Asn Pro Val Ile Leu Pro Gly Gly Phe His Pro |     |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |     |
| aac gtg aaa acc att ttt ctg acc aaa gat aac ccg att ccg gat cag |     |     | 432 |
| Asn Val Lys Thr Ile Phe Leu Thr Lys Asp Asn Pro Ile Pro Asp Gln |     |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |     |
| att gcg cat aaa cgc gaa att att aac att aaa acc ctg tgg cag gcg |     |     | 480 |
| Ile Ala His Lys Arg Glu Ile Ile Asn Ile Lys Thr Leu Trp Gln Ala |     |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 | 160 |
| aaa acc gcg acc gaa aaa acc aaa att ctg agc ttt ttt gaa att gat |     |     | 528 |
| Lys Thr Ala Thr Glu Lys Thr Lys Ile Leu Ser Phe Phe Glu Ile Asp |     |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |     |
| atg cag gaa att agc gtg att aaa aac cgc agc ttt gtg ctg tat acc |     |     | 576 |
| Met Gln Glu Ile Ser Val Ile Lys Asn Arg Ser Phe Val Leu Tyr Thr |     |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |     |
| cag ccg ctg agc gaa gat aaa ctg ctg acc gaa gcg gaa aaa att gat |     |     | 624 |
| Gln Pro Leu Ser Glu Asp Lys Leu Leu Thr Glu Ala Glu Lys Ile Asp |     |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |     |

att tat cgc acc att ctg acc aaa tat aac cat agc cag acc gtg att 672  
 Ile Tyr Arg Thr Ile Leu Thr Lys Tyr Asn His Ser Gln Thr Val Ile  
           210                          215                          220

aaa ccg cat ccg cgc gat aaa acc gat tat aaa cag ctg ttt ccg gat 720  
 Lys Pro His Pro Arg Asp Lys Thr Asp Tyr Lys Gln Leu Phe Pro Asp  
 225                          230                          235                          240

gcg tat gtg atg aaa ggc acc tat ccg agc gaa ctg ctg acc ctg ctg 768  
 Ala Tyr Val Met Lys Gly Thr Tyr Pro Ser Glu Leu Leu Thr Leu Leu  
                           245                          250                          255

ggc gtg aac ttt aac aaa gtg att acc ctg ttt agc acc gcg gtg ttt 816  
 Gly Val Asn Phe Asn Lys Val Ile Thr Leu Phe Ser Thr Ala Val Phe  
                           260                          265                          270

gat tat ccg aaa gaa aaa att gat ttt tat ggc acc gcg gtg cat ccg 864  
 Asp Tyr Pro Lys Glu Lys Ile Asp Phe Tyr Gly Thr Ala Val His Pro  
                           275                          280                          285

aaa ctg ctg gat ttt ttt gat 885  
 Lys Leu Leu Asp Phe Phe Asp  
           290                          295

<210> 2

<211> 295

<212> PRT

<213> Haemophilus ducreyi

<400> 2

Met Lys Glu Ile Ala Ile Ile Ser Asn Gln Arg Met Phe Phe Leu Tyr  
 1                          5                          10                          15

Cys Leu Leu Thr Asn Lys Asn Val Glu Asp Val Phe Phe Ile Phe Glu  
                           20                          25                          30

Lys Gly Ala Met Pro Asn Asn Leu Thr Ser Ile Ser His Phe Ile Val  
           35                          40                          45

Leu Asp His Ser Lys Ser Glu Cys Tyr Asp Phe Phe Tyr Phe Asn Phe

|                                                                 |  |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|--|-----|--|-----|
| 50                                                              |  | 55  |  | 60  |
| Ile Ser Cys Lys Tyr Arg Leu Arg Gly Leu Asp Val Tyr Gly Ala Asp |  |     |  |     |
| 65                                                              |  | 70  |  | 75  |
|                                                                 |  |     |  | 80  |
| His Ile Lys Gly Ala Lys Phe Phe Leu Glu Arg His Arg Phe Phe Val |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 85  |  | 90  |
|                                                                 |  |     |  | 95  |
| Val Glu Asp Gly Met Met Asn Tyr Ser Lys Asn Met Tyr Ala Phe Ser |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 100 |  | 105 |
|                                                                 |  |     |  | 110 |
| Leu Phe Arg Thr Arg Asn Pro Val Ile Leu Pro Gly Gly Phe His Pro |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 115 |  | 120 |
|                                                                 |  |     |  | 125 |
| Asn Val Lys Thr Ile Phe Leu Thr Lys Asp Asn Pro Ile Pro Asp Gln |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 130 |  | 135 |
|                                                                 |  |     |  | 140 |
| Ile Ala His Lys Arg Glu Ile Ile Asn Ile Lys Thr Leu Trp Gln Ala |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 145 |  | 150 |
|                                                                 |  |     |  | 155 |
|                                                                 |  |     |  | 160 |
| Lys Thr Ala Thr Glu Lys Thr Lys Ile Leu Ser Phe Phe Glu Ile Asp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 165 |  | 170 |
|                                                                 |  |     |  | 175 |
| Met Gln Glu Ile Ser Val Ile Lys Asn Arg Ser Phe Val Leu Tyr Thr |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 180 |  | 185 |
|                                                                 |  |     |  | 190 |
| Gln Pro Leu Ser Glu Asp Lys Leu Leu Thr Glu Ala Glu Lys Ile Asp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 195 |  | 200 |
|                                                                 |  |     |  | 205 |
| Ile Tyr Arg Thr Ile Leu Thr Lys Tyr Asn His Ser Gln Thr Val Ile |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 210 |  | 215 |
|                                                                 |  |     |  | 220 |
| Lys Pro His Pro Arg Asp Lys Thr Asp Tyr Lys Gln Leu Phe Pro Asp |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 225 |  | 230 |
|                                                                 |  |     |  | 235 |
|                                                                 |  |     |  | 240 |
| Ala Tyr Val Met Lys Gly Thr Tyr Pro Ser Glu Leu Leu Thr Leu Leu |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 245 |  | 250 |
|                                                                 |  |     |  | 255 |
| Gly Val Asn Phe Asn Lys Val Ile Thr Leu Phe Ser Thr Ala Val Phe |  |     |  |     |
|                                                                 |  | 260 |  | 265 |
|                                                                 |  |     |  | 270 |

Asp Tyr Pro Lys Glu Lys Ile Asp Phe Tyr Gly Thr Ala Val His Pro  
275 280 285

Lys Leu Leu Asp Phe Phe Asp  
290 295

<210> 3

<211> 76

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

gattatcgat aagcttatga aagaaattgc gattattagc aaccagcgca tgttttttct 60

gtattgcctg ctgacc

76

<210> 4

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 4

ggcatcgcg ctttttcaaa aataaaaaac acatcttcca cgtttttggtt ggtcagcagg 60

caatacagaa

70

<210> 5

<211> 73

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 5

tttgaaaaag gcgcgatgcc gaacaacctg accagcatta gccattttat tgtgctggat 60

catagcaaaa gcg 73

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 72

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 6

gcaggcgata tttgcagcta ataaagttaa aataaaaaaa atcatagcat tcgcttttgc 60

tatgatccag ca 72

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 98

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 7

tagctgcaaa tategcctgc gcggcctgga tgtgtatggc gcggatcata tttaaaggcgc 60

gaaatttttt ctggaacgcc atcgtttttt tgtggtgg 98

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 74

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 8

tgcgaaacag gctaaacgca tacatgtttt tgctatagtt catcatgcca tcttccacca 60

caaaaaagcg atgg 74

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 96

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 9

tgcgttttagc ctgttttcgca cccgcaaccc ggtgattctg ccgggcggct ttcattccgaa 60

cgtgaaaacc attttttctga ccaaagataa cccgat 96

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 82

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 10

ttttcgctg ccacagggtt ttaatgttaa taatttcgcg tttatgcgca atctgatccg 60

gaatcgggtt atctttggtc ag 82

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 97

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 11  
aaccctgtgg caggcgaaaa ccgcgaccga aaaaaccaa attctgagct tttttgaaat 60  
tgatatgcag gaaattagcg tgattaaaaa ccgcage 97

<210> 12  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 12  
ttttttccgc ttcggtcagc agtttatctt cgctcagcgg ctgggtatac agcacaaagc 60  
tgcggttttt aatcacgc 78

<210> 13  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 13  
gctgaccgaa gcggaaaaaa ttgatattta tcgaccatt ctgaccaaataaaccatag 60  
ccagaccgtg attaaaccgc a 81

<210> 14  
<211> 88  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 14

tcggataggt gcctttcatc acatacgcac cggaaacag ctgtttataa tcggttttat 60

cgcgcggatg cggtttaatc acggtctg 88

<210> 15

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 15

gatgaaagge acctatccga gcgaactgct gacctgctg ggcgtgaact ttaacaaagt 60

gattaccctg tttagcaccg cgggtgttga ttatccga 98

<210> 16

<211> 92

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 16

atgcggatcc ttaatcaaaa aaatccagca gtttcggatg caccgcggtg ccataaaaaat 60

caattttttc tttcggataa tcaaacaccg cg 92

<210> 17

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 17

gattatcgat aagcttatga aagaaattgc gatt

34

<210> 18

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 18

atgcggatcc ttaatcaaaa aaatccagca gtttc

35

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/03110

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 15/31, 15/54, 1/21, 9/10, C12P19/26

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09 - 15/90, 1/21, 9/10, C12P19/26

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

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

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JICST FILE (JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                | Relevant to claim No. |
|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Y         | The Journal of Biological Chemistry, Vol.274, No.7, (1999), Joel A. Bozue et al., "Haemophilus ducreyi Produces a Novel Sialyltransferase", pp.4106-4114                                          | 1-20                  |
| Y         | Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.53, No.3, (March 2000), Endo, T. et al., "Large-scale production of CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial coupling", pp.257-261 | 1-11                  |
| Y         | Nucleic Acids Research, Vol.28, No.1, (January 2000), Yasukazu Nakamura et al., "Codon usage tabulated from international DNA sequence databases: status for the year 2000", p.292                | 7, 12-20              |
| A         | JP, 4-211375, A (Ajinomoto Co., Inc.),<br>03 August, 1992 (03.08.92) (Family: none)                                                                                                               | 1-20                  |
| A         | JP, 11-253163, A (Toyobo Co., Ltd.),<br>21 September, 1999 (21.09.99) (Family: none)                                                                                                              | 1-20                  |
| A         | Jikken Igaku, Vol.13, No.17, (1995), Takashi YASUKAWA et al., "Kouzou Kaiseki no tameno Tanpakushitsu Tairyou                                                                                     | 1-20                  |

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

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
02 May, 2001 (02.05.01)Date of mailing of the international search report  
15 May, 2001 (15.05.01)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP01/03110

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
|           | san Seikei", pp.2051-2055                                                          |                       |

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09, 15/31, 15/54, 1/21, 9/10, C12P19/26

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl<sup>7</sup> C12N15/09 - 15/90, 1/21, 9/10, C12P19/26

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), JICSTファイル(JOIS),  
SwissProt/PIR/GeneSeq, GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                                         | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| Y               | The Journal of Biological Chemistry, Vol.274, No.7, (1999),<br>Joel A.Bozue et al., "Haemophilus ducreyi Produces a Novel<br>Sialyltransferase", p.4106-4114                                              | 1-20             |
| Y               | Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.53, No.3,<br>(March 2000), Endo, T. et al., "Large-scale production of<br>CMP-NeuAc and sialylated oligosaccharides through bacterial<br>coupling", p.257-261 | 1-11             |

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

## \* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

02.05.01

国際調査報告の発送日

15.05.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内田 俊生

4B

2936

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |                                                                                                                                                                                              |                  |
|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示                                                                                                                                                            | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| Y                     | Nucleic Acids Research, Vol.28, No.1, (January 2000),<br>Yasukazu Nakamura et al., "Codon usage tabulated from<br>international DNA sequence databases: status for the year<br>2000", p. 292 | 7, 12-20         |
| A                     | JP, 4-211375, A (味の素株式会社) 3. 8月. 1992 (03. 08. 92)<br>(ファミリーなし)                                                                                                                              | 1-20             |
| A                     | JP, 11-253163, A (東洋紡績株式会社) 21. 9月. 1999 (21. 09. 99)<br>(ファミリーなし)                                                                                                                           | 1-20             |
| A                     | 実験医学, Vol. 13, No. 17, (1995), 安川孝史 外2名著, 「構造解<br>析のための蛋白質大量産生系」, p. 2051-2055                                                                                                               | 1-20             |