

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公 開 特 許 公 報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-242533

(P2004-242533A)

(43) 公開日 平成16年9月2日(2004.9.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 5 0
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 9/88	
審査請求 未請求 請求項の数 53 O L (全 40 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-33932 (P2003-33932)

(22) 出願日 平成15年2月12日 (2003.2.12)

(71) 出願人 000006035

三菱レイヨン株式会社

東京都港区港南一丁目6番41号

(74) 代理人 100091096

弁理士 平木 祐輔

(74) 代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(74) 代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(72) 発明者 秋山 卓理

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号

三菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

(72) 発明者 水無 渉

東京都港区港南1丁目6番41号 三菱レイヨン株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変型エチレンジアミン-N, N' -ジコハク酸: エチレンジアミンリアーゼ

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 改変型、特に耐熱性の向上したエチレンジアミン-N, N' -ジコハク酸: エチレンジアミンリアーゼの提供。

【解決手段】 *Brevundimonas diminuta* を由来とする、特定のアミノ酸配列から成るタンパク質、又は上記のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N' -ジコハク酸: エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 2】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、1 又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 3】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、120 番目のリジン残基、166 番目のイソロイシン残基及び365 番目のアラニン残基のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 10

【請求項 4】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも120 番目のリジン残基がグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 5】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも166 番目のイソロイシン残基がセリンに置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 20

【請求項 6】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも166 番目のイソロイシン残基がスレオニンに置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 7】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも365 番目のアラニン残基がバリンに置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 8】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも120 番目のリジン残基がグルタミン酸に、166 番目のイソロイシン残基がセリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 30

【請求項 9】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも120 番目のリジン残基がグルタミン酸に、166 番目のイソロイシン残基がスレオニンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 10】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも166 番目のイソロイシン残基がセリンに、365 番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 40

【請求項 11】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも166 番目のイソロイシン残基がスレオニンに、365 番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 12】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも 120 番目のリジン残基がグルタミン酸に、166 番目のイソロイシン残基がセリンに、365 番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 13】

配列番号 1 記載のアミノ酸配列において、少なくとも 120 番目のリジン残基がグルタミン酸に、166 番目のイソロイシン残基がスレオニンに、365 番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【請求項 14】

請求項 1 に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

10

【請求項 15】

以下の (a) 又は (b) の遺伝子 DNA。

(a) 配列番号 2 記載の塩基配列から成る遺伝子 DNA。

(b) 配列番号 2 記載の塩基配列又はその一部の配列からなる DNA と相補的な配列からなる 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、エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子 DNA

【請求項 16】

請求項 2 に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

20

【請求項 17】

配列番号 2 記載の塩基配列において、1 又は複数の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列から成る請求項 16 記載の遺伝子 DNA。

【請求項 18】

請求項 3 に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

【請求項 19】

配列番号 2 記載の塩基配列において、358 番目から 360 番目、496 番目から 498 番目及び 1093 番目から 1095 番目の塩基のうち少なくとも 1 つの塩基が他の異なる塩基に置換された塩基配列から成る請求項 18 記載の遺伝子 DNA。

【請求項 20】

請求項 4 に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

30

【請求項 21】

配列番号 2 記載の塩基配列において、358 番目から 360 番目の塩基 A A A が G A A 又は G A G に置換された塩基配列から成る請求項 20 記載の遺伝子 DNA。

【請求項 22】

配列番号 2 記載の塩基配列において、358 番目の塩基アデニンがグアニンに置換された塩基配列から成る請求項 20 記載の遺伝子 DNA。

【請求項 23】

請求項 5 に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

【請求項 24】

配列番号 2 記載の塩基配列において、496 番目から 498 番目の塩基 A T C が A G C、A G T 又は T C N (N は A、G、C 又は T を表す。) に置換された塩基配列から成る請求項 23 記載の遺伝子 DNA。

40

【請求項 25】

配列番号 2 記載の塩基配列において、497 番目の塩基チミンがグアニンに置換された塩基配列から成る請求項 23 記載の遺伝子 DNA。

【請求項 26】

請求項 6 に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 DNA。

【請求項 27】

配列番号 2 記載の塩基配列において、496 番目から 498 番目の塩基 A T C が A C N (

50

NはA、G、C又はTを表す。)に置換された塩基配列から成る請求項26記載の遺伝子DNA。

【請求項28】

配列番号2記載の塩基配列において、497番目の塩基チミンがシトシンに置換された塩基配列から成る請求項26記載の遺伝子DNA。

【請求項29】

請求項7に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項30】

配列番号2記載の塩基配列において、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)に置換された塩基配列から成る請求項29記載の遺伝子DNA。 10

【請求項31】

配列番号2記載の塩基配列において、1094番目の塩基シトシンがチミンに置換された塩基配列から成る請求項29記載の遺伝子DNA。

【請求項32】

請求項8に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項33】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目から360番目の塩基AAAがGAA又はGAGに、496番目から498番目の塩基ATCがAGC、AGT又はTCN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項32記載の遺伝子DNA。 20

【請求項34】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目の塩基アデニンがグアニンに、497番目の塩基チミンがグアニンにそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項32記載の遺伝子DNA。

【請求項35】

請求項9に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項36】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目から360番目の塩基AAAがGAA又はGAGに、496番目から498番目の塩基ATCがACN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項35記載の遺伝子DNA。 30

【請求項37】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目の塩基アデニンがグアニンに、497番目の塩基チミンがシトシンにそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項35記載の遺伝子DNA。

【請求項38】

請求項10に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項39】

配列番号2記載の塩基配列において、496番目から498番目の塩基ATCがAGC、AGT又はTCN(NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項38記載の遺伝子DNA。 40

【請求項40】

配列番号2記載の塩基配列において、497番目の塩基チミンがグアニンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項38記載の遺伝子DNA。

【請求項41】

請求項11に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項42】

配列番号2記載の塩基配列において、496番目から498番目の塩基ATCがACN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項41記載の遺伝子DNA。 50

NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項41記載の遺伝子DNA。

【請求項43】

配列番号2記載の塩基配列において、497番目の塩基チミンがシトシンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項41記載の遺伝子DNA。

【請求項44】

請求項12に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項45】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目から360番目の塩基AAAがGAA又はGAGに、496番目から498番目の塩基ATCがAGC、AGT又はTCN(NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項44記載の遺伝子DNA。

【請求項46】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目の塩基アデニンがグアニンに、497番目の塩基チミンがグアニンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項44記載の遺伝子DNA。

【請求項47】

請求項13に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

【請求項48】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目から360番目の塩基AAAがGAA又はGAGに、496番目から498番目の塩基ATCがACN(NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項47記載の遺伝子DNA。

【請求項49】

配列番号2記載の塩基配列において、358番目の塩基アデニンがグアニンに、497番目の塩基チミンがシトシンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る請求項47記載の遺伝子DNA。

【請求項50】

請求項14～49いずれか1項に記載の遺伝子DNAをベクターDNAに挿入した組換えDNA。

【請求項51】

請求項50記載の組換えDNAを含む形質転換体又は形質導入体。

【請求項52】

請求項51記載の形質転換体又は形質導入体を培養し、得られる培養物からエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを採取することを特徴とするエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼの製造方法。

【請求項53】

フマル酸とジアミンとを、請求項51記載の形質転換体又は形質導入体の存在下で反応させ、得られる反応産物からジアミノアルキレン-N,N'-ジコハク酸を採取することを特徴とするジアミノアルキレン-N,N'-ジコハク酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は新規なエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質、およびそれをコードする遺伝子DNAに関する。さらに該酵素の変異体として誘導されうる改変型エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミン

10

20

30

40

50

リアーゼをコードする遺伝子DNA、該改変型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼをコードする遺伝子DNAを含む組換えDNA、該改変型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼをコードする遺伝子DNAを含む組換えDNAを含む形質転換体または形質導入体、およびそれら形質転換体または形質導入体を用いたジアミノアルキレン-N, N'-ジコハク酸の製造法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ジアミノアルキレン-N, N'-ジコハク酸は、医農薬合成中間体として重要である一方、重金属を捕捉するという特異な性質を持つことから、自然界に放出された後に生分解を受けやすい可能性を持つ該化合物の光学活性体は、キレート剤や洗剤用ビルダーなどの用途が見込まれている。

10

【0003】

本出願人らは先に、微生物の触媒作用を利用してフマル酸あるいはマレイン酸と各種アミンから効率よく光学活性S, S'-ジアミノアルキレン-N, N'-ジコハク酸を合成する新規な製造方法を提案している（特開平9-140390号、同9-289895号および同10-52292号公報記載）。さらには、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を単離同定し、遺伝子組換えの手法を用いることで、菌体の触媒活性の向上および菌体生産性の改善に成功している（特開平10-210984号公報記載）。

20

【0004】

ところで、一般的に微生物菌体内にはフマラーゼが存在することが広く知られている。フマラーゼは、フマル酸に水添加してリンゴ酸を生成する酵素である。従って、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有する微生物を用いてジアミノアルキレン-N, N'-ジコハク酸を製造しようとする場合、リンゴ酸等の副生物の生成を避けるために、微生物菌体内のフマラーゼを失活させる必要がある。これを解決する手段として、本出願人らは先に、微生物菌体をアルカリ水溶液中で処理することにより、菌体内フマラーゼ活性を低減できることを見出している（特開平11-196882号公報記載）。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

上記方法によるフマラーゼ失活処理においては、フマラーゼの失活速度は処理温度に依存するため、高温であればあるほど短時間での失活が可能となる。また、宿主微生物によってフマラーゼの安定性は異なるが、フマラーゼが失活しにくい微生物を用いた場合においても、より高温での失活処理が望まれる。したがって、本発明は、耐熱性を向上させたエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを提供することを目的とする。

30

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を重ねた結果、新規に見出されたブレブンデモナス・ディミニユタ (*Brevundimonas diminuta*) MR-E001株由来であるエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼのアミノ酸配列において、少なくとも一つ以上のアミノ酸残基を天然アミノ酸のグループから選択される残基で置換することにより、該酵素の耐熱性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。すなわち、本願は以下の発明を提供するものである。

40

【0007】

(1) 配列番号1記載のアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(2) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、1又は複数のアミノ酸残基が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク

50

酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(3) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、120番目のリジン残基、166番目のイソロイシン残基及び365番目のアラニン残基のうち少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(4) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも120番目のリジン残基がグルタミン酸に置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(5) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも166番目のイソロイシン残基がセリンに置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 10

(6) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも166番目のイソロイシン残基がスレオニンに置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(7) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも365番目のアラニン残基がバリンに置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(8) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも120番目のリジン残基がグルタミン酸に、166番目のイソロイシン残基がセリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 20

(9) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも120番目のリジン残基がグルタミン酸に、166番目のイソロイシン残基がスレオニンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(10) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも166番目のイソロイシン残基がセリンに、365番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

【0008】

(11) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも166番目のイソロイシン残基がスレオニンに、365番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 30

(12) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも120番目のリジン残基がグルタミン酸に、166番目のイソロイシン残基がセリンに、365番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。

(13) 配列番号1記載のアミノ酸配列において、少なくとも120番目のリジン残基がグルタミン酸に、166番目のイソロイシン残基がスレオニンに、365番目のアラニン残基がバリンにそれぞれ置換されたアミノ酸配列から成り、且つ、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質。 40

(14) (1)に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

(15) 以下の(a)又は(b)の遺伝子DNA。

(a) 配列番号2記載の塩基配列から成る遺伝子DNA。

(b) 配列番号2記載の塩基配列又はその一部の配列からなるDNAと相補的な配列からなる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、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子DNA

(16) (2)に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。 50

(1 7) 配列番号 2 記載の塩基配列において、1 又は複数の塩基が欠失、置換又は付加された塩基配列から成る (1 6) 記載の遺伝子 D N A。

(1 8) (3) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

(1 9) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目から 3 6 0 番目、4 9 6 番目から 4 9 8 番目及び 1 0 9 3 番目から 1 0 9 5 番目の塩基のうち少なくとも 1 つの塩基が他の異なる塩基に置換された塩基配列から成る請求項 1 8 記載の遺伝子 D N A。

(2 0) (4) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

【 0 0 0 9 】

(2 1) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目から 3 6 0 番目の塩基 A A A が G A A 又は G A G に置換された塩基配列から成る (2 0) 記載の遺伝子 D N A。 10

(2 2) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目の塩基アデニンがグアニンに置換された塩基配列から成る (2 0) 記載の遺伝子 D N A。

(2 3) (5) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

(2 4) 配列番号 2 記載の塩基配列において、4 9 6 番目から 4 9 8 番目の塩基 A T C が A G C、A G T 又は T C N (N は A、G、C 又は T を表す。) に置換された塩基配列から成る (2 3) 記載の遺伝子 D N A。

(2 5) 配列番号 2 記載の塩基配列において、4 9 7 番目の塩基チミンがグアニンに置換された塩基配列から成る (2 3) 記載の遺伝子 D N A。

(2 6) (6) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

(2 7) 配列番号 2 記載の塩基配列において、4 9 6 番目から 4 9 8 番目の塩基 A T C が A C N (N は A、G、C 又は T を表す。) に置換された塩基配列から成る (2 6) 記載の遺伝子 D N A。 20

(2 8) 配列番号 2 記載の塩基配列において、4 9 7 番目の塩基チミンがシトシンに置換された塩基配列から成る (2 6) 記載の遺伝子 D N A。

(2 9) (7) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

(3 0) 配列番号 2 記載の塩基配列において、1 0 9 3 番目から 1 0 9 5 番目の塩基 G C C が G T N (N は A、G、C 又は T を表す。) に置換された塩基配列から成る (2 9) 記載の遺伝子 D N A。

【 0 0 1 0 】

(3 1) 配列番号 2 記載の塩基配列において、1 0 9 4 番目の塩基シトシンがチミンに置換された塩基配列から成る (2 9) 記載の遺伝子 D N A。 30

(3 2) (8) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

(3 3) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目から 3 6 0 番目の塩基 A A A が G A A 又は G A G に、4 9 6 番目から 4 9 8 番目の塩基 A T C が A G C、A G T 又は T C N (N は A、G、C 又は T を表す。) にそれぞれ置換された塩基配列から成る (3 2) 記載の遺伝子 D N A。

(3 4) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目の塩基アデニンがグアニンに、4 9 7 番目の塩基チミンがグアニンにそれぞれ置換された塩基配列から成る (3 2) 記載の遺伝子 D N A。

(3 5) (9) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。 40

(3 6) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目から 3 6 0 番目の塩基 A A A が G A A 又は G A G に、4 9 6 番目から 4 9 8 番目の塩基 A T C が A C N (N は A、G、C 又は T を表す。) にそれぞれ置換された塩基配列から成る (3 5) 記載の遺伝子 D N A。

(3 7) 配列番号 2 記載の塩基配列において、3 5 8 番目の塩基アデニンがグアニンに、4 9 7 番目の塩基チミンがシトシンにそれぞれ置換された塩基配列から成る (3 5) 記載の遺伝子 D N A。

(3 8) (1 0) に記載されたタンパク質をコードする遺伝子 D N A。

(3 9) 配列番号 2 記載の塩基配列において、4 9 6 番目から 4 9 8 番目の塩基 A T C が A G C、A G T 又は T C N (N は A、G、C 又は T を表す。) に、1 0 9 3 番目から 1 50

095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る(38)記載の遺伝子DNA。

(40) 配列番号2記載の塩基配列において、497番目の塩基チミンがグアニンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る(38)記載の遺伝子DNA。

【0011】

(41) (11)に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

(42) 配列番号2記載の塩基配列において、496番目から498番目の塩基ATCがACN(NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る(41)記載の遺伝子DNA。 10

(43) 配列番号2記載の塩基配列において、497番目の塩基チミンがシトシンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る(41)記載の遺伝子DNA。

(44) (12)に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

(45) 配列番号2記載の塩基配列において、358番目から360番目の塩基AAAがGAA又はGAGに、496番目から498番目の塩基ATCがAGC、AGT又はTCN(NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る(44)記載の遺伝子DNA。 20

(46) 配列番号2記載の塩基配列において、358番目の塩基アデニンがグアニンに、497番目の塩基チミンがグアニンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る(44)記載の遺伝子DNA。

(47) (13)に記載されたタンパク質をコードする遺伝子DNA。

(48) 配列番号2記載の塩基配列において、358番目から360番目の塩基AAAがGAA又はGAGに、496番目から498番目の塩基ATCがACN(NはA、G、C又はTを表す。)に、1093番目から1095番目の塩基GCCがGTN(NはA、G、C又はTを表す。)にそれぞれ置換された塩基配列から成る(47)記載の遺伝子DNA。

(49) 配列番号2記載の塩基配列において、358番目の塩基アデニンがグアニンに、497番目の塩基チミンがシトシンに、1094番目の塩基シトシンがチミンにそれぞれ置換された塩基配列から成る(47)記載の遺伝子DNA。 30

(50) (14)~(49)記載の遺伝子DNAをベクターDNAに挿入した組換えDNA。

【0012】

(51) (50)記載の組換えDNAを含む形質転換体又は形質導入体。

(52) (51)記載の形質転換体又は形質導入体を培養し、得られる培養物からエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを採取することを特徴とするエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼの製造方法。 40

(53) フマル酸とジアミンとを、(51)記載の形質転換体又は形質導入体の存在下で反応させ、得られる反応産物からジアミノアルキレン-N,N'-ジコハク酸を採取することを特徴とするジアミノアルキレン-N,N'-ジコハク酸の製造方法。

【0013】

【発明の実施の形態】

以下、本発明について詳細に説明する。本発明におけるエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ(「EDDase」ともいう)とは、フマル酸とエチレンジアミンからエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸を可逆的に生成する能力を持つ酵素を示すが、反応の条件によってはエチレンジアミン-N-モノコハク酸を生成することもある。さらに本酵素は、エチレンジアミン以外のジアミン類にも反応性を示し 50

、対応するジアミノアルキレン - N , N ' - ジコハク酸を生成する。また、生成するジアミノアルキレン - N , N ' - ジコハク酸は、多くの場合光学活性体であるが、ラセミ体を生成する酵素もある。このような反応性を示す一群の酵素は、本出願人らにより自然界から分離・同定された複数の属に属する細菌類に見出されており、これら細菌類は上記特開平 9 - 140390号、同 9 - 289895号および同 10 - 52292号公報に記載されている。さらに、本出願人らは、特開平 10 - 52292号公報記載のブレブンディモナス (*Brevundimonas*) sp . T N - 3 株よりエチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を単離し、そのアミノ酸配列および遺伝子配列を初めて明らかにするとともに、該遺伝子産物の大量発現の可能性を有する形質転換体の作出に成功している (特開平 10 - 210984号公報記載) 。

10

【0014】

一方、近年の組換え DNA 技術の進歩により、酵素の作用を実質的に変えることなく、その酵素の構成アミノ酸の 1 個以上を欠失、付加、削除、挿入、もしくは他のアミノ酸で置換した変異体を作製することが可能となっている。これら変異体は、置換、欠失、付加、削除、もしくは挿入されるアミノ酸残基の個所および置換されるアミノ酸の種類によっては、変異の導入されていない野生型酵素と比較して、有機溶媒耐性、耐熱性、耐酸性、耐アルカリ性、基質特異性、基質親和性などの性能が著しく向上することが知られている。これら性能の向上は、触媒としての酵素の安定化、反応工程の簡略化、反応収率の向上等を通じて、酵素反応を利用した工業的生産における生産コストの大幅な低減をもたらすことがある。従って、多くの酵素において様々な性能が向上した有用な改良酵素の創製が行

20

【0015】

本明細書中、「野生型」とは、自然界より分離されてきた微生物に保持されていた酵素を構成するアミノ酸配列、および該酵素をコードする遺伝子の塩基配列が、意図的または非意図的に欠失、削除、挿入、もしくは他のアミノ酸あるいは塩基で置換されていないことを意味する。

【0016】

本出願人らは、更なる有用なエチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼを求めて、該酵素活性を保有する微生物のスクリーニングを行った。その結果、高い該酵素活性を持つブレブンディモナス・ディミニユタ MR - E 001 株 (以下 MR - E 001 株とすることがある) を単離するとともに、MR - E 001 株よりエチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を取得した。さらに、該酵素のアミノ酸配列において少なくとも一つ以上のアミノ酸残基を天然アミノ酸のグループから選択される残基で置換することにより該酵素の耐熱性が向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0017】

本発明の改変型エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼは、例えば、次のようにして得ることができる。まず、MR - E 001 株より、野生型エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の取得を行う。遺伝子の取得には、如何なる公知の手段を用いてもよい。例えば、MR - E 001 株より調製した染色体 DNA を鋳型として PCR (Polymerase Chain Reaction) を行い、該遺伝子の一部を含む DNA 断片を得る。PCR に用いるプライマーは、一般的には、該酵素を単離精製した後、アミノ酸分析を行い、得られたアミノ酸配列情報に基づいて設計したデジェネレートプライマーを用いることができる。また、「目的とする該遺伝子の配列が既に知られている他生物種由来の該遺伝子の配列と同一性を有することが期待される」場合、あるいは「既に知られている他生物種由来の該遺伝子の配列と同一性を有する遺伝子の取得を目的とする」場合は、その既知の他生物種由来の該遺伝子によりコードされるアミノ酸配列情報よりデジェネレートプライマーを設計し、利用することも可能である。かくして設計されたプライマーを用い、MR - E 001 株染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、得られた増幅 DNA 産物を後に行うコロニーハイブリ

40

50

ダイゼーションのプロープとして用いる。

【0018】

続いてDNAライブラリーの作製を行う。公知の方法、例えばSaito and Miuraらの方法(Biochem. Biophys. Acta, 72, 619 (1963))に従って調製したMR-E001株染色体を適切な制限酵素により切断、または部分切断し、同制限酵素切断末端と連結可能な切断末端を生じさせることができる制限酵素で処理したベクターDNAに連結し、適切な微生物宿主の形質転換体または形質導入体を作製することにより、該染色体のDNAライブラリーを得る。形質転換体または形質導入体の宿主とする微生物は特に限定されるものではなく、例えば大腸菌を用いる場合、大腸菌K12株、JM109株、XL1-Blue株などを挙げることができる。形質転換体作製に用いるプラスミドDNAとしては、例えば大腸菌を宿主とする場合、大腸菌中での自律複製可能な領域を有しているpBR322、pUC18、pBluescript IISK(+)などが挙げられる。また、上記プラスミドベクターDNAに限定されることなく、それ以外のファージベクターDNAを用いて形質導入体を作製してもよい。

10

【0019】

ここで、遺伝子操作に関する工程における説明中、作製する組換えDNAを含む微生物は、プラスミドベクターDNAを用いた場合は形質転換体といい、ファージベクターDNAを用いた場合は形質導入体という。上記形質転換体及び形質導入体は、いずれも本発明に含まれる。以下、プラスミドベクターDNAを用いた形質転換体の場合を例として述べる。

20

【0020】

かくして得られた該染色体のDNAライブラリーに対し、上述のPCRによる増幅DNA産物をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行う。コロニーハイブリダイゼーションは通常行いうる方法でよく、例えば次のようにして行うことができる。すなわち、寒天培地上に生育した該染色体DNAライブラリー形質転換体をナイロンメンブレン上に写し取った後、溶菌させてDNAを固定化する。上述のPCRによる増幅DNA産物を、例えばDNA Labeling kit(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて標識してプローブとした後、メンブレンに対してハイブリダイゼーションを行い、DNA Luminescent Detection kit(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)などを用いて、陽性クローンの選択を行うことができる。得られた陽性クローンより定法に従ってプラスミドDNAを調製し、必要に応じてサブクロニングを行った後、挿入断片の塩基配列を決定する。塩基配列の決定方法は如何なる方法でもよく、通常、市販のキット等を用いたジデオキシ法(Methods in Enzymology, 101, 20-78, 1983)により決定することができる。このようにして、MR-E001株由来野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を取得し、また、そのアミノ酸配列および塩基配列を決定することができる。

30

【0021】

次いで、得られた野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼのアミノ酸配列において、少なくとも一つが他の天然アミノ酸残基で置換された改変型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを得るには、如何なる方法でもよく、通常公知の方法で行ない得る。すなわち、野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子DNAに対して、例えば、ヒドロキシルアミンや亜硝酸等の変異源となる薬剤を接触・作用させる方法、紫外線照射により変異を誘発する方法、PCRを用いてランダムに変異を導入する方法、市販のキットを利用して部位特異的な置換を生じさせる方法、遺伝子DNAを選択的に開裂し、次いで選択されたオリゴヌクレオチドを除去・付加し連結する方法等が挙げられる。

40

【0022】

上記処理のいずれかによって種々の変異を持つエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸

50

：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子DNAを得たのち、形質転換体を作製する。形質転換に用いることができるプラスミドベクターとしては、例えば、大腸菌を宿主とする場合、上記DNAライブラリー作製工程で挙げたプラスミドベクターを用いることもできるが、後のスクリーニング工程において、熱処理後のエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ残存活性を効率よく検出するため、発現効率の高い発現ベクター、例えばtrcプロモーターを有する発現ベクターpKK233-2（アマシャム社製）、あるいは後の実施例で示すpKK233-2の誘導体pFY529Vなどを用いることが好ましい。

【0023】

但し、本発明において使用するベクター及び宿主は、上記プラスミド及び大腸菌に限定されるものではない。例えば、ベクターとしてはプラスミドDNA、バクテリオファージDNA、レトロトランスポゾンDNA、人工染色体DNAなどが挙げられる。

【0024】

本発明のエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子DNAは、該遺伝子DNAが導入される宿主生物において発現されるように、遺伝子をベクターに組み込むことが必要である。そこで、本発明のベクターには、本発明の遺伝子DNAのほか、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、スプライシングシグナル、ポリA付加シグナル、選択マーカー、リボソーム結合配列（SD配列）等を連結することができる。なお、選択マーカーとしては、例えばジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子等が挙げられる。

【0025】

本発明の形質転換体は、本発明の組換えベクターを、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子が発現し得るように宿主中に導入することにより得ることができる。ここで、宿主としては、例えば、大腸菌、枯草菌等の細菌が挙げられる。また、酵母、動物細胞、昆虫細胞、植物細胞等を用いることもできる。

【0026】

大腸菌としては、例えばエッシャーヒア・コリ（*Escherichia coli*）等が挙げられ、枯草菌としては、例えばバチルス・ズブチリス（*Bacillus subtilis*）等が挙げられる。細菌への組換えベクターの導入方法としては、細菌にDNAを導入する方法であれば特に限定されるものではない。例えばカルシウムイオンを用いる方法、エレクトロポレーション法等が挙げられる。

【0027】

酵母を宿主とする場合は、例えばサッカロミセス・セレビスエ（*Saccharomyces cerevisiae*）、シゾサッカロミセス・ポンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、ピヒア・パストリス（*Pichia pastoris*）等が用いられる。酵母への組換えベクターの導入方法としては、酵母にDNAを導入する方法であれば特に限定されず、例えばエレクトロポレーション法、スフェロプラスト法、酢酸リチウム法等が挙げられる。

【0028】

動物細胞を宿主とする場合は、サル細胞COS-7、Vero、CHO細胞、マウスL細胞、ラットGH3、ヒトFL細胞等が用いられる。動物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等が挙げられる。

【0029】

昆虫細胞を宿主とする場合は、Sf9細胞、Sf21細胞等が用いられる。昆虫細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばリン酸カルシウム法、リポフェクション法、エレクトロポレーション法等が用いられる。

【0030】

植物細胞を宿主とする場合は、トウモロコシ、イネ、タバコ等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。植物細胞への組換えベクターの導入方法としては、例えばアグ

ロバクテリウム法、パーティクルガン法、PEG法、エレクトロポレーション法等が用いられる。

【0031】

上記の通り、種々のエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を含む組換えDNAを保有する形質転換体を得ることができる。

【0032】

宿主を大腸菌とした場合は、得られた形質転換体を寒天培地上で培養してコロニーを形成させた後、液体培養し、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを生産させる。得られた培養物を、例えば、40～65の温度下、30分間の熱処理に供した後、残存エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を測定し、残存エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性の高い形質転換体を選択する。かくして得られた優良形質転換体の組換えDNAに挿入されているエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の塩基配列の決定は、例えば、ジデオキシ法により行なうことができる。

10

【0033】

配列番号2に本発明のエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子DNAの塩基配列を、配列番号1に本発明の遺伝子によりコードされるアミノ酸配列を例示する。

【0034】

また、酵素に耐熱性を付与する複数の異なる単変異置換を組み合わせ、多重変異体とすることにより、単変異体よりもさらに耐熱性の向上した変異酵素を創製できる可能性があることが知られている。多重変異体を作製する手段は如何なる方法でもよく、例えば、合成一本鎖オリゴヌクレオチドを用いて部位特異的な置換を生じさせる方法、複数の異なる単変異個所を含むDNA断片を制限酵素で切断して連結させる方法などが挙げられる。

20

【0035】

したがって、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼがその酵素活性を有する限り、配列番号1に示すアミノ酸配列において複数個、好ましくは1又は数個のアミノ酸に欠失、置換、付加等の変異が生じてもよい。例えば、配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が欠失してもよく、配列番号1に示されるアミノ酸配列に1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が付加してもよく、あるいは、配列番号1に示されるアミノ酸配列の1～10個、好ましくは1～5個のアミノ酸が他のアミノ酸に置換してもよい。

30

【0036】

本発明においては、特に、配列番号1に示すアミノ酸配列において120番目のLys、166番目のIle、365番目のAlaのうち少なくとも1つのアミノ酸が他のアミノ酸に置換したものが好ましい。上記3箇所のアミノ酸置換は、任意に組み合わせることができる。好ましい置換の態様を以下に示す。なお、以下の置換の態様において、数字は配列番号1に示すアミノ酸配列の位置の番号、番号の左のアルファベットは置換前のアミノ酸（1文字表記）、数字の右のアルファベットは置換後のアミノ酸（1文字表記）である。

40

K 1 2 0 E

I 1 6 6 S

I 1 6 6 T

A 3 6 5 V

(K 1 2 0 E , I 1 6 6 S)

(K 1 2 0 E , I 1 6 6 T)

(I 1 6 6 S , A 3 6 5 V)

(I 1 6 6 T , A 3 6 5 V)

(K 1 2 0 E , I 1 6 6 S , A 3 6 5 V)

(K 1 2 0 E , I 1 6 6 T , A 3 6 5 V)

50

【0037】

また、K120Eの置換を生じさせるときの塩基置換は以下の通りである。

120番目のLysに対応する配列番号2に示す塩基配列の位置は358番目から360番目であり、その塩基配列は「AAA」である。一方、グルタミン酸のコドンはGAA又はGAGであるため、本発明においては、AAAがGAA又はGAGとなるように塩基を置換させることができる。特に、358番目のAをGに置換すること(AAA→GAA)が好ましい。

【0038】

上記と同様にして、I166Sの置換を生じさせるときは、配列番号2に示す塩基配列において496番目から498番目の塩基ATCを、AGC、AGT、ACA、ACC、ACG又はACTに置換させることができる。特に、497番目のTをGに置換させること(ATC→AGC)が好ましい。I166Tの置換を生じさせるときは、配列番号2に示す塩基配列において496番目から498番目の塩基ATCを、ACA、ACC、ACG又はACTに置換させることができる。特に、497番目のTをCに置換させること(ATC→ACC)が好ましい。

10

【0039】

A365Vの置換を生じさせるときは、配列番号2に示す塩基配列において1093番目から1095番目の塩基GCCを、GTA、GTG、GTC又はGTTに置換することができる。特に、1094番目のCをTに置換すること(GCC→GTC)が好ましい。

【0040】

但し、本発明においては、置換後のアミノ酸は上記例に限定されるものではない。したがって、配列番号1に示すアミノ酸配列の120番目、166番目、365番目のアミノ酸のうち少なくとも1つのアミノ酸残基となるように、当該アミノ酸をコードするコドンの少なくとも1つの塩基を他の塩基に置換することができる。

20

【0041】

ここで、「エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性」とは、フマル酸及びジアミンとを反応させてジアミノアルキレン-N,N'-ジコハク酸を生成するための触媒活性を意味する。

【0042】

また、配列番号2記載の塩基配列又はその一部の配列からなるDNAと相補的な配列からなる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、エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質をコードする遺伝子DNAも本発明の遺伝子DNAに含まれる。ストリンジェントな条件とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成される条件をいう。例えば、相同性が高い核酸同士、すなわち80%以上、好ましくは90%以上の相同性を有するDNAであって、エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有するタンパク質をコードするDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件が挙げられる。より具体的には、ナトリウム濃度が300～2000mM、好ましくは600～900mMであり、温度が40～75℃、好ましくは55～65℃の条件をいう。

30

40

【0043】

一旦本発明の遺伝子の塩基配列が確定されると、その後は化学合成によって、又はクローニングされたDNAを鋳型としたPCRによって、あるいは該塩基配列を有するDNA断片をプローブとしてハイブリダイズさせることによって、本発明の遺伝子DNAを得ることができる。

【0044】

本発明において、耐熱性とは、野生型エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼが失活する温度範囲においても酵素活性を保持することができる性質を意味し、45～60℃、好ましくは50～60℃である。50～60℃の範囲内において、改変型エチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼは50

50

のときの酵素活性と比較して60%の酵素活性を維持することができる。

【0045】

かくして得られた単変異あるいは多重変異が導入された改変型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を含む組換えプラスミドDNAを保有する形質転換体を用いて、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを製造することができる。また、上記形質転換体を用いて（例えば、大腸菌の形質転換体を用いて）、ジアミノアルキレン-N, N'-ジコハク酸を製造することもできる。

【0046】

エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを製造するには、上記形質転換体を培養し、その培養物から採取することにより得ることができる。「培養物」とは、培養上清、培養細胞若しくは培養菌体、又は細胞若しくは菌体の破砕物のいずれをも意味するものである。本発明の形質転換体を培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行われる。

10

【0047】

大腸菌や酵母菌等の微生物を宿主として得られた形質転換体を培養する培地は、微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うことができる培地であれば、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、グルコース、フラクトース、スクロース、デンプン等の炭水化物、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が挙げられる。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若しくは有機酸のアンモニウム塩又はその他の含窒素化合物のほか、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー等が挙げられる。無機物としては、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、炭酸カルシウム等が挙げられる。培養は、通常、振盪培養又は通気攪拌培養などの好氣的条件下で行う。pHの調整は、無機又は有機酸、アルカリ溶液等を用いて行う。培養中は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加してもよい。

20

【0048】

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場合は、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、イソプロピル-D-チオガラクトシド（IPTG）で誘導可能なプロモーターを有する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IPTG等を培地に添加することができる。また、インドール酢酸（IAA）で誘導可能なtrp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IAA等を培地に添加することができる。

30

【0049】

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、DMEM培地又はこれらの培地に牛胎児血清等を添加した培地等が挙げられる。培養は、通常、5%CO₂存在下、37℃で1～30日行う。培養中は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。

40

【0050】

培養後、本発明のタンパク質が菌体内又は細胞内に生産される場合には、超音波処理、凍結融解の繰り返し、ホモジナイザー処理などを施して菌体又は細胞を破砕することにより目的のタンパク質採取する。また、本発明のタンパク質が菌体外又は細胞外に生産される場合には、培養液をそのまま使用するか、遠心分離等により菌体又は細胞を除去する。その後、タンパク質の単離精製に用いられる一般的な生化学的方法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、ゲルクロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等を単独で又は適宜組み合わせるにより、前記培養物中から本発明のタンパク質を単離精製することができる。

50

【 0 0 5 1 】

形質転換体が植物細胞又は植物組織である場合は、培養は、通常の植物培養用培地、例えば M S 基本培地、L S 基本培地等を用いることにより行うことができる。培養方法は、通常の固体培養法、液体培養法のいずれをも採用することができる。

【 0 0 5 2 】

培養物から本発明のタンパク質を精製するには、まず、セルラーゼ、ペクチナーゼ等の酵素を用いた細胞溶解処理、超音波破碎処理、磨砕処理等により細胞を破壊する。次いで、濾過又は遠心分離等を用いて不溶物を除去し、粗タンパク質溶液を得る。上記粗溶液から本発明のタンパク質を精製するには、塩析、各種クロマトグラフィー（例えばゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー等）、S D S ポリアクリルアミドゲル電気泳動等を単独で又は適宜組み合わせで実施する。

10

【 0 0 5 3 】

ジアミノアルキレン - N , N ' - ジコハク酸を製造するには、下記のようにして行なうことができる。大腸菌形質転換体を培養するには、通常の固体培養法で培養してもよいが、可能な限り液体培養法を採用して培養するのが好ましい。培養に用いる培地としては、例えば、酵母エキス、トリプトン、ポリペプトン、コーンステープリカー、大豆若しくは小麦ふすまの浸出液等の 1 種以上の窒素源に、塩化ナトリウム、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、硫酸マグネシウム、塩化マグネシウム、塩化第二鉄、硫酸第二鉄若しくは硫酸マンガン等の無機塩類の 1 種以上を添加し、更に必要により糖質原料、ビタミン等を適宜添加したものが用いられる。なお、培地の初発 pH は 7 ~ 9 に調整するのが適当である。また、培養は、25 ~ 42 で 6 ~ 24 時間、通気攪拌深部培養、振盪培養、静置培養等により実施するのが好ましい。

20

【 0 0 5 4 】

培養終了後、得られた微生物菌体を集菌し、適当な緩衝液、例えば、50 m M ホウ酸緩衝液（pH 9 . 0）で菌体を洗浄した後、同緩衝液に懸濁することにより菌体懸濁液を調製する。この菌体懸濁液を、例えば、40 ~ 65 の温度下、30 分 ~ 72 時間熱処理することにより、フマラーゼ活性が消失し、かつエチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を有する菌体を調製することができる。かくして得られた菌体を、フマル酸あるいはマレイン酸と各種アミンを含む水溶液中に懸濁して反応させることにより、リンゴ酸等の副生物を含まない、光学活性 S , S - ジアミノアルキレン - N , N ' - ジコハク酸水溶液を製造することができる。

30

なお、ブレブディモナス・ディミニユタ (*Brevundimonas diminuta*) M R - E 0 0 1 株の菌学的性質は下記表のとおりである。

【 0 0 5 5 】

【 表 1 】

MR-E001 株の菌学的性質

形態	桿菌	
グラム染色性	—	
孢子	—	
運動性	+	
鞭毛	極毛	
酸素に対する態度	好気性	
オキシダーゼ	+	10
カタラーゼ	+	
OF テスト	—	
集落の色調	特徴的色素を生成せず	
蛍光色素の生成	—	
PHB の蓄積	+	
栄養要求性	有り	
キノン系	Q-10	
硝酸塩還元	+	20
インドール生成	—	
アルギニンジヒドロラーゼ	—	
尿素分解	—	
エスクリン分解	—	
ゼラチン液化	—	
PNPG	—	
資化性		
グルコース	—	
L-アラビノース	—	
D-マンノース	—	30
D-マンニトール	—	
N-アセチル-D-グルコサミン	—	
マルトース	—	
グルコン酸カリウム	+	
n-カプリン酸	—	
アジピン酸	+	
dl-リンゴ酸	+	
クエン酸	+	
酢酸フェニル	—	40

【 0 0 5 6 】

なお、ブレブンディモナス・ディミニユタ (*Brevundimonas diminuta*) MR - E 0 0 1 株は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に F E R M P - 1 9 2 0 3 として 2 0 0 3 年 2 月 5 日付けで寄託されている。

【 0 0 5 7 】

【 実施例 】

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明する。しかしながら、実施例は本発明の 50

具体的な認識を得る一助とみなすべきものであり、本発明の範囲を何等限定するものではない。

【0058】

[実施例1] MR-E001株由来野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の取得

(1) MR-E001株染色体DNAの調製

MR-E001株を 100ml の EDDS 培地 (0.2% エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸、0.2% グルコース、0.1% バクトイーストエキス、0.05% ポリペプトン、0.1% 硫酸マグネシウム・7水塩、25% (v/v) 燐酸緩衝液 (1M、pH 7.0)、0.5% (v/v) 金属塩混合物溶液 (硫酸ナトリウム 56g、塩化マグネシウム・6水塩 8g、塩化カルシウム 0.8g、硫酸マンガン・4水塩 0.6g、塩化第二鉄・6水塩 0.12g、硫酸亜鉛 0.06g / 100ml) 中、30℃にて4日間振盪培養した後に集菌し、この菌体を Saline-EDTA 溶液 (0.1M EDTA、15M NaCl、pH 8.0) 4ml に懸濁し、リゾチーム 8mg を加えて 37℃ で 1 時間振盪した後凍結した。次に、10ml の Tris-SDS 液 (1% SDS、0.1M NaCl、0.1M Tris、pH 9.0) を穏やかに振盪しながら加え、さらにプロテイナーゼ K (メルク社製) (終濃度 1mg) を加え 37℃ で 1 時間振盪した。次に、等量の TE 飽和フェノール (TE : 10mM Tris、1mM EDTA、pH 8.0) を加えて攪拌後遠心し、上層を採り 2 倍量のエタノールを加えた後ガラス棒で DNA を巻きとり、90%、80%、70% のエタノールで順次フェノールを取り除いた。次に、DNA を 3ml の TE 緩衝液に溶解させ、リボヌクレアーゼ A 溶液 (100、15 分間の熱処理済み) を 10mg/ml の終濃度となるように加え 37℃ で 30 分間振盪した。さらにプロテイナーゼ K を加え 37℃ で 30 分間振盪した後、等量の TE 飽和フェノールを加え遠心し、上層と下層に分離させ上層を採取した (以後この操作をフェノール抽出と呼ぶ)。フェノール抽出を 2 回繰り返した後、同量のクロロホルム (4% イソアミルアルコール含有) を加え同様の抽出操作を繰り返した (以後この操作をクロロホルム抽出と呼ぶ)。その後上層に 2 倍量のエタノールを加えガラス棒で DNA を巻き取り回収し、染色体 DNA 標品を得た。

【0059】

(2) プローブの調製

本出願人らは先に、ブレブディモナス (*Brevundimonas*) sp. TN-3 株よりエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の単離に成功し、そのアミノ酸配列および遺伝子配列を初めて明らかにしている (特開平 10-210984 号公報記載)。該公報において用いられたデジェネレイトプライマー、すなわち、配列番号 3 および配列番号 4 に示されるような配列を有する合成 DNA (それぞれ、プライマー #1 および #2 とする) を用い、工程 (1) で得られた MR-E001 株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。

プライマー #1 : ATGACICCI C AYAAYCCIGA YGC (配列番号 3)

プライマー #2 : CCDAITYTGCA T YTTICCI GC RACIGAICCD
ATYTC (配列番号 4)

【0060】

すなわち、MR-E001株染色体DNA 1μl、10倍濃度の反応緩衝液 10μl、10mM dNTP 4μl、プライマー #1 および #2 各々 1μl (100pmol 濃度相当)、ExTaq (宝酒造社製) 1μl を加えて 100μl とした。この溶液について、95℃、30 秒間 (デナチュレーション過程)、55℃、30 秒間 (アニーリング過程)、72℃、2 分間 (エクステンション過程) のインキュベーションを 30 サイクル行った。反応終了後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿により増幅された DNA を回収した。これを 1.0% アガロースゲル電気泳動で分離後、MR-E001株のエチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレン

ジアミンリアーゼ遺伝子の一部をコードすると考えられる約300bpのDNA断片を得た。こうして得られたDNA断片をDIG DNA Labeling kit (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて標識し、プローブとした。

【0061】

(3) DNAライブラリーの作製

MR-E001株染色体DNA 10 μ l に10倍濃度制限酵素反应用緩衝液5 μ l、滅菌水33 μ l、制限酵素 KpnI 2 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cにて16時間反応させた後エタノール沈殿によりDNAを回収した。アガロースゲル電気泳動を行い、6.5 Kb から 5.5 KbのDNA断片をゲルから切り出し、DNA PREP (ダイアトロニ社製)を用いて回収した。このDNA断片をDNA Ligation Kit Ver. 1 (宝酒造社製)を用いて大腸菌ベクター pUC18のKpnI部位に挿入し、組換えDNAライブラリーを作製した。ライゲーションに用いた pUC18断片は次のように作製した。pUC18 保存液 2 μ l に対し、10倍濃度制限酵素用緩衝液5 μ l、滅菌水40 μ l、制限酵素 KpnI 3 μ l を加え、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿させた後乾燥して50 μ lの滅菌水に溶解させた。さらにアルカリフوسفターゼ(宝酒造社製)1 μ l、10倍濃度緩衝液10 μ l、滅菌水39 μ l を加え65 $^{\circ}$ Cで反応後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿後乾燥して滅菌水に溶解させた。

【0062】

(4) 大腸菌形質転換体の作製および組換えDNAの選別

大腸菌 JM109株をLB培地(1% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、0.5% NaCl) 1mlに接種し37 $^{\circ}$ C、5時間好氣的に前培養し、この培養物 0.4mlを SOB培地 40ml(2% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、10mM NaCl、2.5mM KCl、1mM MgSO₄、1mM MgCl₂) に加え、18 $^{\circ}$ Cで20時間培養した。この培養物を遠心分離により集菌した後、冷TF溶液(20mM PIPES-KOH(pH 6.0)、200mM KCl、10mM CaCl₂、40mM MnCl₂) を13ml加え、0 $^{\circ}$ Cで10分間放置した。その後、再度遠心し、上澄を除いた後、沈殿した大腸菌を冷TF溶液 3.2mlに懸濁し、0.22mlのジメチルスルフォキシドを加え0 $^{\circ}$ Cで10分間放置した。こうして作製したコンピテントセル 200 μ l に工程(3)で作製した組換えプラスミドDNAを含有する溶液(DNAライブラリー)を10 μ l加え、0 $^{\circ}$ Cで30分放置後、42 $^{\circ}$ Cで30秒間ヒートショックを与え、0 $^{\circ}$ Cで2分間冷却後、SOC培地(20mM グルコース、2% バクトトリプトン、0.5% バクトイーストエキス、10mM NaCl、2.5mM KCl、1mM MgSO₄、1mM MgCl₂) 1ml を添加して37 $^{\circ}$ Cにて1時間振盪培養した。これを 200 μ l ずつLB Amp寒天培地(アンピシリン 100mg/L、1.5% 寒天を含有するLB培地)にまき、37 $^{\circ}$ Cで培養した。寒天培地上に生育した形質転換体コロニーについて、コロニーハイブリダイゼーション法によりエチレンジアミン-N,N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を保有すると考えられる形質転換体を選別した。すなわち、寒天培地上に生育した形質転換体をナイロンメンブレン(バイオダイン A : 日本ポール社製)上に移し、菌体を溶かしてDNAを固定した後、これを工程(2)で作製したプローブ(約300bp)で処理し、DIG Luminescent Detection Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用い、目的の組換えDNAを持つコロニーを選別した。

【0063】

(5) 組換えプラスミドの調製

工程(4)で選別した形質転換体を 100mlのLB Amp培地(アンピシリン 100mg/Lを含有するLB培地)にて37 $^{\circ}$ Cで一晩培養し、集菌後、Flexi Prep (アマシャムバイオサイエンス社製)を用いてプラスミドDNAを回収した。得られた組換えプラスミドDNAを pEDS9001と名付けた。

【 0 0 6 4 】

(6) 制限酵素地図の作製およびエチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子領域の特定

工程 (5) で得られたプラスミド p E D S 9 0 0 1 を数種の制限酵素を用いて切断し制限酵素地図を作製した (図 1) 。さらに、通常行われるようにサブクローニングを行った。すなわち、p E D S 9 0 0 1 を制限酵素 B a m H I で切断した後アガロースゲル電気泳動を行い、約 5 . 3 K b の D N A 断片をゲルから切り出し、D N A P R E P (ダイアトロン社製) を用いて回収した。D N A L i g a t i o n K i t V e r . 1 (宝酒造社製) を用いて自己連結反応を行った後、大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換することにより、エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を含むと考えられる約 2 . 6 K b の断片が挿入されたプラスミド (p E D S 9 0 0 3) (図 2) を得た。

10

【 0 0 6 5 】

(7) 塩基配列の決定

工程 (6) で特定された領域周辺の塩基配列を蛍光シーケンサ A L F I I (アマシャムバイオサイエンス社製) を用いて決定した。その結果、配列番号 1 に示されるアミノ酸配列から成るオープンリーディングフレームをコードする塩基配列 (配列番号 2) が見い出された。

【 0 0 6 6 】

[実施例 2] M R - E 0 0 1 株由来野生型エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を導入した形質転換体の活性評価

20

実施例 1 の工程 (6) で得られたエチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を有する組換えプラスミド p E D S 9 0 0 3 2 μ l に対し、10 倍濃度制限酵素用緩衝液 2 μ l 、滅菌水 15 μ l 、制限酵素 K p n I 1 μ l を添加し、37 にて2時間反応させた。エタノール沈殿によりプラスミド D N A を回収し、乾燥後 17 μ l の滅菌水、2 μ l の 10 倍濃度制限酵素緩衝液、制限酵素 B a m H I 1 μ l を添加して 37 にて2時間反応させた。この反応液からアガロースゲル電気泳動により約 2 . 6 K b の断片を調製し、大腸菌ベクター p U C 1 1 9 に挿入した。作製したライゲーション溶液を用いて大腸菌 J M 1 0 9 を形質転換して目的のプラスミドを得た。ここで作製したプラスミドを p E D S 9 0 2 0 (図 3) と名付け、また形質転換体を J M 1 0 9 / p E D S 9 0 2 0 と名付けた。J M 1 0 9 / p E D S 9 0 2 0 およびコントロールとして J M 1 0 9 / p E D S 0 2 0 (特開平 1 0 - 2 1 0 9 8 4 号公報記載) を、それぞれ L B A m p 培地 1 m l に接種して 37 にて8時間振盪培養後、1 m M i s o p r o p y l - t h i o g a l a c t o s i d e を含有する 40 m l の L B A m p 培地で 37 、30 時間培養した。得られた培養物を 10 m M リン酸ナトリウム緩衝液 (p H 8 . 0) で洗浄後、2 m l の同緩衝液に懸濁した。得られた菌体懸濁液の一部を 342 m M フマル酸と 171 m M エチレンジアミンを含む p H 8 . 0 の水溶液 50 m l に懸濁し 30 で反応させた。時間間隔を空けて反応混合液の一部を (0 . 1 m l) を取り出し、0 . 42 N の N a O H 水溶液 0 . 9 m l 中に加え反応を停止した。菌体を遠心分離により除いた後、H P L C を用いて生成した S , S - エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸を分析した (W A K O S I L 5 C 8 (和光純薬社製) [溶出液 ; 10 m M 水酸化テトラ - n - ブチルアンモニウムと 0 . 4 m M C u S O ₄ を含む 50 m M リン酸 ; p H 2]) 。上記測定条件下において 1 分間に 1 μ m o l の S , S - エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸を生成させる酵素量を酵素単位 (U) として、J M 1 0 9 / p E D S 9 0 2 0 および J M 1 0 9 / p E D S 0 2 0 の菌体あたり (O D 630 あたり) の活性を求めたところ、それぞれ 1 . 22 m U / O D m l 、0 . 89 m U / O D m l であり、M R - E 0 0 1 株由来エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼが高い該酵素活性を有することが確認された。なお、p E D S 9 0 2 0 は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) に F E R M P - 19202 として、

30

40

50

2003年2月5日付で寄託されている。

【0067】

[実施例3] 改変型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の取得

(1) 野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子への変異導入

実施例2で得られたプラスミドpEDS9020をもとに、野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子へのランダム変異導入を行った。変異導入は、PCRにおけるヌクレオチドの誤取り込みによる塩基置換を利用した。エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子開始コドン領域を含むオリゴヌクレオチドED-01(配列番号5)と、該遺伝子終止コドンより約50bp下流領域を含むED-02(配列番号6)を変異誘発PCRのプライマーとし、以下のような組成のPCR反応液100μlを調製した。

プライマー：

ED-01：CGCCATGGCC CCGCATAAACC CAGATGCCAC C
(配列番号5)

(下線部分は制限酵素NcoI切断認識部位)

ED-02：AAACAAGCTT CGTCATGGCT ATCCCCCTC(配列番号6)

(下線部分は制限酵素HindIII切断認識部位)

反応液組成：

鋳型DNA(上記工程で調製したpEDS9020) 1μl

10x PCR Buffer (GIBCO社製) 10μl

50mM MgCl₂ (GIBCO社製) 3μl

プライマーED-01 1μl

プライマーED-02 1μl

2.5mM dNTP 各々2μl

10mM dITP 2μl

10mM dBrAUTP 2μl

滅菌水 71μl

Taq DNAポリメラーゼ(GIBCO社製) 1μl

【0068】

上記反応液に対し、94℃、30秒(デナチュレーション過程)、68℃、180秒(アニーリング過程・エクステンション過程)のインキュベーションを30サイクル行った。上記PCR終了後、反応液10μlを0.7%アガロースゲルにより電気泳動を行って、約1.5kbの増幅断片の検出を行った。また、耐熱性評価のコントロールとして用いるため、通常のPCRにて野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を増幅した。すなわち、以下のような組成のPCR反応液100μlを調製した。

鋳型DNA(pEDS9020) 1μl

10x Pyrobest Buffer (宝酒造社製) 10μl

プライマーED-01 1μl

プライマーED-02 1μl

5mM dNTP 各々2μl

滅菌水 78μl

PyrobestTM DNAポリメラーゼ(宝酒造社製) 1μl

【0069】

上記反応液に対し、94℃、30秒(デナチュレーション過程)、68℃、180秒(アニーリング過程・エクステンション過程)のインキュベーションを30サイクル行った。上記PCR終了後、反応液10μlを0.7%アガロースゲルにより電気泳動を行って、

約 1.5 kb の増幅断片の検出を行った。

【0070】

プライマー ED-01 および ED-02 中には、制限酵素 NcoI 切断認識部位および制限酵素 HindIII 切断認識部位がそれぞれ導入されており（プライマー ED-01 及び ED-02 の塩基配列の下線部分）、増幅 DNA 産物を両制限酵素で切断することにより、後述する発現ベクター pFY529V の NcoI 部位 - HindIII 部位間に容易に挿入することが可能となる。

【0071】

（2）発現ベクターの構築

後述のスクリーニング工程において、熱処理後のエチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ残存活性を効率よく検出するため、コピー数と発現効率の高い大腸菌発現ベクター pFY529V を作製した（図 4）。trc プロモーターを有する発現ベクター pKK233-2（アマシャム社製）5 µl に制限酵素 NaeI 1 µl、ScaI 1 µl、10 倍濃度制限酵素反応用緩衝液 1 µl、滅菌水 2 µl を加え、37 °C にて 12 時間切断反応を行った。切断後、0.7% アガロースゲルにより電気泳動を行い、該プラスミドの複製開始点を含まない NaeI - ScaI 断片（1.2 kb）を切り出し、DNA PREP（ダイアトロン社製）を用いて、該 DNA 断片を含む TE 溶液（10 mM Tris、1 mM EDTA、pH 8.0）3 µl を回収した。この操作と並行して、高コピー数ベクターである pUC18 2 µl に制限酵素 PvuII 1 µl、ScaI 1 µl、10 倍濃度制限酵素反応用緩衝液 1 µl、滅菌水 5 µl を加え、37 °C にて 12 時間切断反応を行った。切断後、0.7% アガロースゲルにより電気泳動を行い、該プラスミドの複製開始点を含む PvuII - ScaI 断片（1.6 kb）を切り出し、DNA PREP（ダイアトロン社製）を用いて、該 DNA 断片を含む TE 1 µl を回収した。こうして得られた両 DNA 断片を DNA Ligation Kit Ver. 1（宝酒造社製）により連結させた。pKK233-2 由来 NaeI - ScaI 断片溶液 3 µl、pUC18 由来 PvuII - ScaI 断片溶液 1 µl、キット中の A 液 16 µl、キット中の B 液 4 µl を混合し、16 °C にて 16 時間連結反応を行った。連結反応後の反応液を用い、実施例 1（4）記載の方法により大腸菌 JM109 を形質転換した。得られた形質転換体コロニーより約 10 クローンを LB Amp 培地 1.5 ml に接種し、37 °C で 12 時間振盪培養した。培養後、この培養物を遠心分離により集菌した後、Flexi Prep（アマシャムバイオサイエンス社製）を用いることにより、プラスミド DNA を抽出した。得られたプラスミド DNA を制限酵素 ScaI で切断後、0.7% アガロースゲルにより電気泳動を行い、pKK233-2 由来 NaeI - ScaI 断片（1.2 kb）と pUC18 由来 PvuII - ScaI 断片（1.6 kb）が正しく連結されているクローンを選んで pFY529V と命名し、変異ライブラリーの発現ベクターとして用いた。

【0072】

（3）変異ライブラリーの作製

工程（1）の PCR で得られた変異導入エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を含む反応液を、常法に従ってエタノール沈殿により精製を行い、沈殿物を 70 µl の滅菌水に再懸濁した。10 倍濃度制限酵素反応用緩衝液 10 µl、制限酵素 NcoI 10 µl、HindIII 10 µl を加え、37 °C にて 12 時間切断反応を行った。切断反応後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿を行い、沈殿物を 100 µl の滅菌水に再懸濁して変異 DNA 断片溶液とした。この操作と並行して、工程（2）で作製した発現ベクター pFY529V 3 µl に、滅菌水 67 µl、10 倍濃度制限酵素反応用緩衝液 10 µl、制限酵素 NcoI 10 µl、HindIII 10 µl を加え、37 °C にて 12 時間切断反応を行った。切断後、フェノール抽出およびクロロホルム抽出を行い、エタノール沈殿により精製した後、沈殿物を 10 µl の滅菌水に再懸濁して切断済み pFY529V 溶液とした。変異 DNA 断片と発現ベクター pFY529V の連結は、DNA Ligation Kit Ve

r . 1 (宝酒造社製)を用いて行った。上記の変異DNA断片溶液3 μ l、切断済みpFY529V溶液1 μ l、キット中のA液16 μ l、キット中のB液4 μ lを混合し、16にて16時間連結反応を行った。連結反応後の反応液を用いて、実施例1(工程(4))記載の方法により大腸菌JM109を形質転換し、種々の変異導入EDDSase遺伝子を保有する形質転換体を得た。また、以上と同様の操作を、工程(1)で増幅した野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を挿入断片として行った。得られた形質転換体コロニーよりプラスミドを抽出し、蛍光シーケンサーALF II(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて塩基配列を確認した結果、実施例1(工程(7))で決定した野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼの塩基配列(配列番号2)と同一であった{但し、プライマーED-01のNcoI部位導入による、4番目の塩基変化(A→G)は除く}。このプラスミドをpEDTrc9003と命名し、該プラスミドを含む大腸菌、すなわちJM109/pEDTrc9003を、後述する(4)の耐熱性向上エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼのスクリーニング工程におけるコントロールとして用いた。なお、pEDTrc9003は、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6)にFERM P-19201として2003年2月5日付けで寄託されている。

10

【0073】

(4)耐熱性向上エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼのスクリーニング

20

工程(3)で得られた変異エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を含むJM109形質転換体およびコントロールとするJM109/pEDTrc9003を、48穴マルチディッシュに1.5mlずつ分注したLB Amp培地にそれぞれ接種し、37にて12時間液体培養した。得られた培養物を、50の温度下、30分間の熱処理に供した後、実施例2記載の方法により、残存エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ活性の測定を行った。工程(3)で得られた形質転換体約10000株についてスクリーニングを行った結果、野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼを保有するJM109/pEDTrc9003がもはや完全にその活性を消失していたのに対し、該酵素活性が残存している株が4株得られた。

30

【0074】

(5)変異の同定

工程(4)で得られた4株の耐熱性向上候補株に含有される変異導入エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ遺伝子について、どの部位にどのような変異が導入されたのかを確認すべく以下のように解析を行った。4株の耐熱性向上候補株に含まれる組換えプラスミドDNAを、Flexi Prep(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて精製し、得られた組換えプラスミドDNAをそれぞれpEDTrcI-2、pEDTrcI-23、pEDTrcJ-05、pEDTrcK-01と命名した。また、それぞれのプラスミドに含まれる変異酵素自体をI-2、I-23、J-05、K-01と命名した。これらの組換えプラスミドDNAに含まれる変異エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の塩基配列を、蛍光シーケンサーALF II(アマシャムバイオサイエンス社製)を用いて決定した。決定した各変異エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ遺伝子の塩基配列と野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼの塩基配列(配列番号2)とを比較解析した結果、pEDTrcI-2では166番目のイソロイシン残基(ATC)がスレオニン(ACC)に、pEDTrcI-23では120番目のリジン残基(AAA)がグルタミン酸(GAA)に、pEDTrcJ-05では166番目のイソロイシン残基(ATC)がセリン(AGC)に、pEDTrcK-01では365番目のアラニン残基(GCC)がバリン(GTC)にそれぞれ置換されている単変異体であることが明らかになった[()内は、各々のアミノ酸をコードする塩基配列の

40

50

変化を示す]。

【0075】

(6) 単変異体の耐熱性評価

工程(5)で同定された4種類の単変異体エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ(I-2、I-23、J-05、K-01)の耐熱性をより詳細に調べた。単変異体エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼを保有する大腸菌4株(JM109/pEDTrcI-2、JM109/pEDTrcI-23、JM109/pEDTrcJ-05、JM109/pEDTrcK-01)、および野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼを保有する大腸菌JM109/pEDTrc9003を、LB Amp培地1.5mlに接種して30℃にて8時間振盪培養した後、それぞれの培養液を500ml容の三角フラスコに調製したLB Amp培地40mlに400μlずつ接種し、37℃にて12時間振盪培養した。得られた培養物より1.5mlを採取し、遠心分離により集菌した後、50mMホウ酸緩衝液(pH9.0)で洗浄した後、1.5mlの同緩衝液に懸濁することにより菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液に対して超音波破碎を行い、粗酵素抽出液を得た。得られた粗酵素抽出液を40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃の各温度下、それぞれ30分間熱処理した後、直ちに4℃に冷却した。熱処理後、実施例2記載の方法により、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ活性の測定を行い、熱処理を行わずに4℃で保冷したものをそれぞれの相対活性値のコントロール(100%)として、残存相対活性を求めた。

10

20

【0076】

結果を図5に示す。図5において、縦軸は残存エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ活性を、横軸は処理温度を示す。野生型エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼは50℃で完全に該酵素活性が消失していたのに対し、単変異体I-2、I-23、J-05、K-01はそれぞれ50℃で75%、50℃で85%、60℃で12%、55℃で12%の残存相対活性を保持しており、野生型と比較してこれらの単変異体の耐熱性が向上していることが確認された。

【0077】

[実施例4] 多重変異体の作製と耐熱性評価

(1) 多重変異体の作製

実施例3で耐熱性の向上が確認された4種類の単変異体におけるアミノ酸残基の置換を組み合わせるにより、多重変異体を作製した。単変異体I-2、I-23、J-05、K-01の変異個所は、それぞれ166番目のイソロイシン残基、120番目のリジン残基、166番目のイソロイシン残基、366位のアラニン残基であり、エチレンジアミン-N, N'-ジコハク酸:エチレンジアミンリアーゼ遺伝子DNA断片を制限酵素EcoT22I、AccI、ClaIで切断することにより、これらの変異個所を各々一つずつ含むDNA断片が得られる(図6)。切断した単変異体のDNA断片を、異なる単変異体由来の対応するDNA断片と置き換えて再連結することにより、二重変異あるいは三重変異を持つキメラ酵素遺伝子を作製した(図6)。例えば、二重変異体Ch-4の作製は、まず、単変異体I-23をコードする遺伝子を含むpEDTrcI-23を制限酵素NcoIおよびAccIで切断し、切断の結果生じた短いほうのDNA断片(約0.5kb)をアガロースゲル電気泳動により切り出した。同時に、単変異体J-05をコードする遺伝子を含むpEDTrcJ-05を制限酵素NcoIおよびAccIで切断し、切断の結果生じた長いほうのDNA断片(約3.8kb、ベクター含む)をアガロースゲル電気泳動により切り出した。両DNA断片を、DNA PREP(ダイアトロン社製)を用いて回収し、DNA Ligation Kit Ver.1(宝酒造社製)を用いて連結した後、常法に従って大腸菌JM109を形質転換した。得られた形質転換体よりプラスミドを抽出し、制限酵素NcoIおよびAccIで切断した後、アガロースゲル電気泳動により正しく連結されていることを確認し、このプラスミドDNAをpEDTrcCh-4、キメラ酵素をCh-4と命名した。同様に、単変異体I-23由来NcoI-AccI

30

40

50

断片（約 0.5 kb）と、単変異体 I - 2 由来 NcoI - AccI 断片（約 3.8 kb、ベクター含む）を連結して得られるプラスミド DNA を pEDTrcCh - 6、キメラ酵素を Ch - 6 と命名した。同様な手法により、単変異体 J - 05 由来 NcoI - ClaI 断片（約 1 kb）と、単変異体 K - 01 由来 NcoI - ClaI 断片（約 3.3 kb、ベクター含む）を連結して得られるプラスミド DNA を pEDTrcCh - 1、キメラ酵素を Ch - 1 とし、単変異体 I - 2 由来 NcoI - ClaI 断片（約 1 kb）と、単変異体 K - 01 由来 NcoI - ClaI 断片（約 3.3 kb、ベクター含む）を連結して得られるプラスミド DNA を pEDTrcCh - 2、キメラ酵素を Ch - 2 とした。また、三重変異体についても、単変異体 I - 23 由来 NcoI - AccI 断片（約 0.5 kb）と単変異体 J - 05 由来 AccI - ClaI 断片（約 0.5 kb）および単変異体 K - 01 由来 NcoI - ClaI 断片（約 3.3 kb、ベクター含む）を連結して得られるプラスミド DNA を pEDTrcCh - 8、キメラ酵素を Ch - 8 とし、単変異体 I - 23 由来 NcoI - AccI 断片（約 0.5 kb）と単変異体 I - 2 由来 AccI - ClaI 断片（約 0.5 kb）および単変異体 K - 01 由来 NcoI - ClaI 断片（約 3.3 kb、ベクター含む）を連結して得られるプラスミド DNA を pEDTrcCh - 10、キメラ酵素を Ch - 10 とした。かくして得られたキメラ酵素の構造を図 6 に示す。

10

【0078】

（2） 多重変異体の耐熱性評価

工程（1）で作製した 6 種類の多重変異体エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ（Ch - 4、Ch - 6、Ch - 1、Ch - 2、Ch - 8、Ch - 10）の耐熱性を調べた。多重変異体エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを保有する大腸菌 6 株（JM109 / pEDTrcCh - 4、JM109 / pEDTrcCh - 6、JM109 / pEDTrcCh - 1、JM109 / pEDTrcCh - 2、JM109 / pEDTrcCh - 8、JM109 / pEDTrcCh - 10）、および野生型エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼを保有する大腸菌 JM109 / pEDTrc9003 を、LB Amp 培地 1.5 ml に接種して 30℃にて 8 時間振盪培養した後、それぞれの培養液を 500 ml 容の三角フラスコに調製した LB Amp 培地 40 ml に 400 μl ずつ接種し、37℃にて 12 時間振盪培養した。得られた培養物より 1.5 ml を採取し、遠心分離により集菌した後、50 mM ホウ酸緩衝液（pH 9.0）で洗浄した後、1.5 ml の同緩衝液に懸濁することにより菌体懸濁液を調製した。この菌体懸濁液に対して超音波破碎を行い、粗酵素抽出液を得た。得られた粗酵素抽出液を 40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃の各温度下、それぞれ 30 分間熱処理した後、直ちに 4℃に冷却した。熱処理後、実施例 2 記載の方法により、エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性の測定を行い、熱処理を行わずに 4℃で保冷したものをそれぞれの相対活性値のコントロールとして、残存相対活性を求めた。結果を図 7 に示す。図 7 において、縦軸は残存エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼ活性を、横軸は処理温度を示す。野生型エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼは 50℃で完全に該酵素活性が消失していたのに対し、多重変異体 Ch - 4、Ch - 6、Ch - 1、Ch - 2、Ch - 8、Ch - 10 はそれぞれ 60℃で 72%、55℃で 89%、60℃で 56%、55℃で 25%、60℃で 90%、55℃で 97% の残存相対活性を保持しており、野生型および単変異体と比較してこれら多重変異体の耐熱性が向上していることが確認された。

20

30

40

【0079】

【発明の効果】

本発明により、ブレブディモナス・ディミニユタ（*Brevundimonas diminuta*）MR - E001 株由来野生型エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼの塩基配列およびアミノ酸配列が提供される。また、野生型エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼより誘導された改変型エチレンジアミン - N, N' - ジコハク酸：エチレンジアミンリアーゼの塩基配列およ

50

びアミノ酸配列が提供される。さらには、野生型および改変型エチレンジアミン - N , N ' - ジコハク酸 : エチレンジアミンリアーゼ遺伝子を含む組換え DNA、該組換え DNA を含む形質転換体または形質導入体、該形質転換体または形質導入体を用いたジアミノアルキレン - N , N ' - ジコハク酸の製造法が提供される。本発明により、効率よくジアミノアルキレン - N , N ' - ジコハク酸を製造することが可能となる。

【 0 0 8 0 】

【 配 列 表 】

SEQUENCE LISTING

10

<110> MITSUBISHI RAYON CO., LTD.

<120> MODIFIED ETHYLENEDIAMINE-N,N'-DISUCCINIC ACID:ETHYLENEDIAMINE LYASE

20

<130> P02-0182

<140>

<141>

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 2.0

30

<210> 1

<211> 495

<212> PRT

<213> *Brevundimonas diminuta*

<221> VARIANT

<222> 1

40

<223> Xaa represents Met or deletion

<400> 1

Xaa Thr Pro His Asn Pro Asp Ala Thr Arg Ile Gly Arg Ala Ser Gly

1

5

10

15

50

Ala Lys Ala Pro Glu Phe Gln Glu Leu Tyr Asp Phe Glu Ala Ala Ala
 20 25 30

Leu Thr Leu Thr Ser Ala Val Phe Pro Tyr Asp Ser Lys Ile His Arg
 35 40 45

Ala His Val Val Met Leu Ala Glu Gln Asp Ile Leu Thr Arg Asp Glu
 50 55 60

10

Ala Ala Ser Ile Leu Asn Gly Leu Ala Lys Ala Asp Glu Leu Ala Gly
 65 70 75 80

Lys Asp Ala Ala Leu Arg Thr Tyr Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Leu Lys
 85 90 95

20

Arg Glu Ile Gly Ser Val Ala Gly Lys Met His Ile Gly Arg Ser Arg
 100 105 110

Asn Asp Leu Ala Asn Ala Gly Lys Arg Met Phe Leu Arg Asp Gln Leu
 115 120 125

30

Leu Arg Thr Val Glu Ala Val Ile Ala Leu Arg Glu Ala Val Val Thr
 130 135 140

Lys Ala Ala Asp His Leu Asp Thr Val Met Val Val Tyr Thr Gln Arg
 145 150 155 160

Lys Glu Ala Gln Pro Ile Thr Leu Gly His Tyr Leu Met Ala Ile Ser
 165 170 175

40

Glu Asn Leu Gly Lys Asn Leu Ala Arg Tyr Arg Glu Leu His Pro Arg
180 185 190

Ile Asn Gln Cys Pro Leu Gly Ala Ala Ala Thr Ala Gly Thr Gly Trp
195 200 205

Pro Leu Asp Arg Asp Arg Thr Ala Ala Leu Leu Gly Phe His Gly Leu
210 215 220

Val Val Asn Ser Ile Glu Gly Val Ala Gly Trp Asp His Val Ala Glu
225 230 235 240

Phe Ala Phe Asp Asn Ala Val Phe Leu Ser Gly Leu Ser Arg Leu Ala
245 250 255

Ser Glu Ile Gln Leu Trp Ser Thr Asp Glu Tyr Gln Met Ala Glu Leu
260 265 270

Asp Ser Ala Phe Ala Gly Thr Ser Ser Ile Met Pro Gln Lys Lys Asn
275 280 285

Pro Asp Ser Leu Glu Arg Ser Arg Lys Ala Ala Phe Ala Ala Met Gly
290 295 300

Pro Leu Val Ala Ile Leu Thr Ser Leu Asn Gly Ile Glu Tyr Gln Tyr
305 310 315 320

Ser Ala Ala Arg Val Glu Leu Glu Pro Arg Ser Ile Asp Ala Leu Ile

10

20

30

40

325	330	335
Ala Ala Thr His Ala Met Thr Gly Val Val Arg Thr Leu His Pro Asn		
340	345	350
Lys Glu Gln Met Leu Arg Tyr Ala Ala Glu Asn Tyr Ala Thr Met Thr		
355	360	365
Asp Leu Thr Asp Leu Leu Val Arg Arg Ile Gly Ile Asp Tyr Arg Glu		
370	375	380
Ala His Glu Ile Val Ala Arg Val Val Met Thr Ala Ile Glu Arg Gly		
385	390	395
Ile Lys Ala Asn Ala Ile Gly Leu Asp Leu Val Gln Glu Ala Ala Val		
405	410	415
Ala Gln Thr Gly Asn Arg Ile Glu Ile Gly Ala Ala Asp Ile Ala Asp		
420	425	430
Ala Leu Asp Pro Val Gln Asn Val Ala Arg Arg Lys Gly Arg Gly Met		
435	440	445
Pro Ala Pro Glu Ser Val Arg Ala Ala Ile Ala Glu Ala Arg Gln Glu		
450	455	460
Leu Asp Ala Asp Lys Ala Trp Leu Glu Asp Arg Arg Ala Gly Leu Ala		
465	470	475
		480

10

20

30

40

Asp Ala Asp Ala Ala Leu Glu Glu Ala Val Ala Gly Ile Thr Thr
 485 490 495

<210> 2

<211> 1488

<212> DNA

<213> *Brevundimonas diminuta*

10

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1485)

<400> 2

20

atg acc ccg cat aac cca gat gcc acc cgt atc ggc cgt gcc agc ggc 48
 Met Thr Pro His Asn Pro Asp Ala Thr Arg Ile Gly Arg Ala Ser Gly
 1 5 10 15

gcg aag gcg ccg gaa ttc cag gaa ctc tat gac ttc gaa gca gcg gca 96
 Ala Lys Ala Pro Glu Phe Gln Glu Leu Tyr Asp Phe Glu Ala Ala Ala
 20 25 30

30

ctc acc ctg acg agc gcc gtc ttt cct tac gac agc aag att cat cgt 144
 Leu Thr Leu Thr Ser Ala Val Phe Pro Tyr Asp Ser Lys Ile His Arg
 35 40 45

gct cac gtc gtc atg ctg gct gaa cag gac atc ctg acc cgg gac gag 192
 Ala His Val Val Met Leu Ala Glu Gln Asp Ile Leu Thr Arg Asp Glu
 50 55 60

40

gct gcc agc atc ctg aac ggg ctg gcc aag gcg gat gaa ctg gcg gga 240
 Ala Ala Ser Ile Leu Asn Gly Leu Ala Lys Ala Asp Glu Leu Ala Gly
 65 70 75 80

aag gac gcg gcg ctg cgc acc tac ctg ccc tat gag gcc gcg ctg aaa 288
 Lys Asp Ala Ala Leu Arg Thr Tyr Leu Pro Tyr Glu Ala Ala Leu Lys
 85 90 95

10

cgc gag atc ggc tcc gtt gcc ggg aag atg cat atc ggg cgc agt cgc 336
 Arg Glu Ile Gly Ser Val Ala Gly Lys Met His Ile Gly Arg Ser Arg
 100 105 110

aac gac ctc gcc aat gcc ggt aaa cgc atg ttc ctg cgt gac cag ctg 384
 Asn Asp Leu Ala Asn Ala Gly Lys Arg Met Phe Leu Arg Asp Gln Leu
 115 120 125

20

ctg cgc acc gtc gag gct gtg atc gca ttg cgc gag gca gtc gtg acc 432
 Leu Arg Thr Val Glu Ala Val Ile Ala Leu Arg Glu Ala Val Val Thr
 130 135 140

30

aag gcc gcc gac cat ctc gac acg gtg atg gtc gtc tac acc cag cgc 480
 Lys Ala Ala Asp His Leu Asp Thr Val Met Val Val Tyr Thr Gln Arg
 145 150 155 160

aag gag gcc cag ccg atc acg ctc ggc cat tac cta atg gcg atc agc 528
 Lys Glu Ala Gln Pro Ile Thr Leu Gly His Tyr Leu Met Ala Ile Ser
 165 170 175

40

gaa aat ctg ggc aag aac ctc gcc cgc tat cgc gag ctc cat ccg cgc 576
 Glu Asn Leu Gly Lys Asn Leu Ala Arg Tyr Arg Glu Leu His Pro Arg
 180 185 190

atc aac caa tgt ccc ctc ggc gcc gct gcc acg gcg ggc acg ggc tgg 624
 Ile Asn Gln Cys Pro Leu Gly Ala Ala Ala Thr Ala Gly Thr Gly Trp
 195 200 205

10

ccg ctg gat cgc gac cgc acc gca gca ctg ctg ggt ttc cac ggg ctc 672
 Pro Leu Asp Arg Asp Arg Thr Ala Ala Leu Leu Gly Phe His Gly Leu
 210 215 220

gtc gtc aac agc atc gag ggc gtg gcc ggc tgg gac cac gtc gcg gaa 720
 Val Val Asn Ser Ile Glu Gly Val Ala Gly Trp Asp His Val Ala Glu
 225 230 235 240

20

ttc gcc ttc gac aat gcc gtc ttc ctg agc ggc ctc agc cgc ctg gct 768
 Phe Ala Phe Asp Asn Ala Val Phe Leu Ser Gly Leu Ser Arg Leu Ala
 245 250 255

tcc gag atc cag ctc tgg agc acg gac gag tat cag atg gcg gaa ctc 816
 Ser Glu Ile Gln Leu Trp Ser Thr Asp Glu Tyr Gln Met Ala Glu Leu
 260 265 270

30

gac tcc gcc ttc gcc ggc acc agc agc atc atg ccg cag aag aaa aac 864
 Asp Ser Ala Phe Ala Gly Thr Ser Ser Ile Met Pro Gln Lys Lys Asn
 275 280 285

40

ccg gat tcg ctg gag cgc agc cgg aag gcc gcc ttc gcg gcg atg ggg 912

Pro Asp Ser Leu Glu Arg Ser Arg Lys Ala Ala Phe Ala Ala Met Gly
 290 295 300

ccg ctg gtc gcc atc ctc acc tct ctc aat ggt atc gag tac cag tac 960

Pro Leu Val Ala Ile Leu Thr Ser Leu Asn Gly Ile Glu Tyr Gln Tyr
 305 310 315 320

agc gcc gcc agg gtc gag ctc gaa ccg cga tcc atc gat gcg ctg atc 1008

Ser Ala Ala Arg Val Glu Leu Glu Pro Arg Ser Ile Asp Ala Leu Ile
 325 330 335

gcg gcc acc cac gcg atg acg ggc gtc gtg cgg acg ctt cat ccc aac 1056

Ala Ala Thr His Ala Met Thr Gly Val Val Arg Thr Leu His Pro Asn
 340 345 350

aag gag cag atg ctg cgc tat gcg gca gag aac tac gcc acc atg acc 1104

Lys Glu Gln Met Leu Arg Tyr Ala Ala Glu Asn Tyr Ala Thr Met Thr
 355 360 365

gac ctg acc gac ctg ctc gtc cgt cgc atc ggc atc gac tat cgc gag 1152

Asp Leu Thr Asp Leu Leu Val Arg Arg Ile Gly Ile Asp Tyr Arg Glu
 370 375 380

gcc cat gag atc gtg gcg cgc gtg gtg atg acg gcg atc gag cgc ggc 1200

Ala His Glu Ile Val Ala Arg Val Val Met Thr Ala Ile Glu Arg Gly
 385 390 395 400

atc aag gcc aac gcc atc gga ctg gac ctc gtg cag gag gcc gcg gtc 1248

Ile Lys Ala Asn Ala Ile Gly Leu Asp Leu Val Gln Glu Ala Ala Val

10

20

30

40

405	410	415		
gcg cag acg ggc aac cgg atc gag atc ggt gcg gcc gac atc gcc gat	1296			
Ala Gln Thr Gly Asn Arg Ile Glu Ile Gly Ala Ala Asp Ile Ala Asp				
420	425	430		
gcg ctc gat ccg gtt cag aac gtc gcc cgt cgc aag ggc agg ggc atg	1344			10
Ala Leu Asp Pro Val Gln Asn Val Ala Arg Arg Lys Gly Arg Gly Met				
435	440	445		
ccc gcg ccc gaa tcc gtc agg gcc gcc atc gcg gag gcg cgt cag gaa	1392			
Pro Ala Pro Glu Ser Val Arg Ala Ala Ile Ala Glu Ala Arg Gln Glu				
450	455	460		
				20
ttg gac gcc gac aag gcc tgg cta gag gac cgg cgc gcc ggg ctg gcc	1440			
Leu Asp Ala Asp Lys Ala Trp Leu Glu Asp Arg Arg Ala Gly Leu Ala				
465	470	475	480	
gat gcg gat gcg gcg ctg gag gag gcg gtg gcc ggc atc acg acc tga	1488			
Asp Ala Asp Ala Ala Leu Glu Glu Ala Val Ala Gly Ile Thr Thr				
485	490	495		30

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

40

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220> modified base

<221> 6

<223> 1

10

<220> modified base

<221> 9

<223> 1

<220> modified base

<221> 18

<223> 1

20

<400> 3

atgacnccnc ayaayccnga ygc

23

<210> 4

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<220> modified base

<221> 15

40

<223> i

<220> modified base

<221> 18

<223> i

<220> modified base

<221> 24

<223> i

10

<220> modified base

<221> 27

<223> i

20

<400> 4

ccdatytgca tyttncengc racnganced atytc

35

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

<400> 5

cgccatggcc ccgcataacc cagatgccac c

31

40

<210> 6

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthetic DNA

10

<400> 6

aaacaagctt cgtcattggct atccccctc

28

【 0 0 8 1 】

【 配列表フリーテキスト 】

配列番号 1 : X a a は M e t 又は欠失を表す

配列番号 3 : 合成 D N A

配列番号 4 : 合成 D N A

配列番号 5 : 合成 D N A

配列番号 6 : 合成 D N A

20

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 プラスミド p E D S 9 0 0 1 の制限酵素地図。

【 図 2 】 プラスミド p E D S 9 0 0 3 の制限酵素地図。

【 図 3 】 プラスミド p E D S 9 0 2 0 の制限酵素地図。

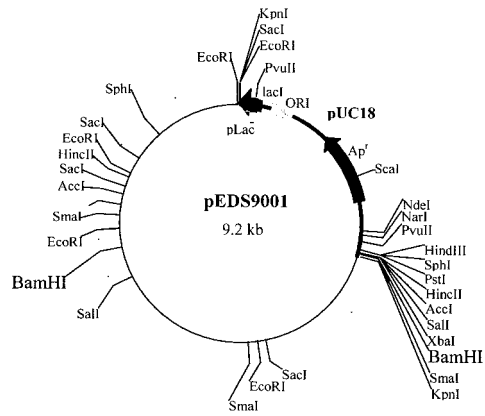
【 図 4 】 発現ベクター p F Y 5 2 9 V の構築図。

【 図 5 】 単変異体の耐熱性評価を示す図。

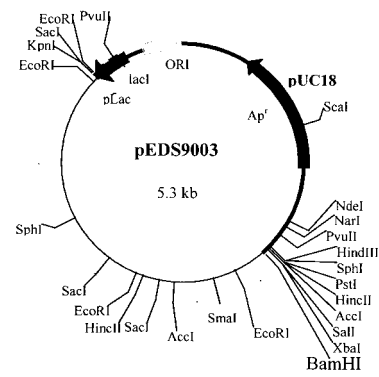
【 図 6 】 単変異体および多重変異体の構造を示す模式図。 は T 4 9 7 C (I l e 1 6 6 30
T h r) の変異を、 は A 3 5 8 G (L y s 1 2 0 G l u) の変異を、 は T 4 9 7 G (I l e 1 6 6 S e r) の変異を、 は C 1 0 9 4 T (A l a 3 6 5 V a l) の変異をそれぞれ示す。

【 図 7 】 多重変異体の耐熱性評価を示す図。

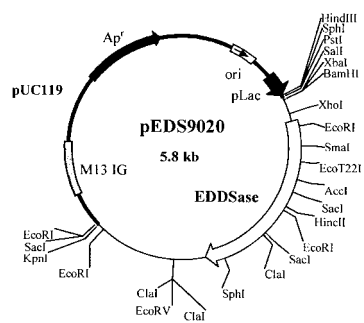
【 図 1 】



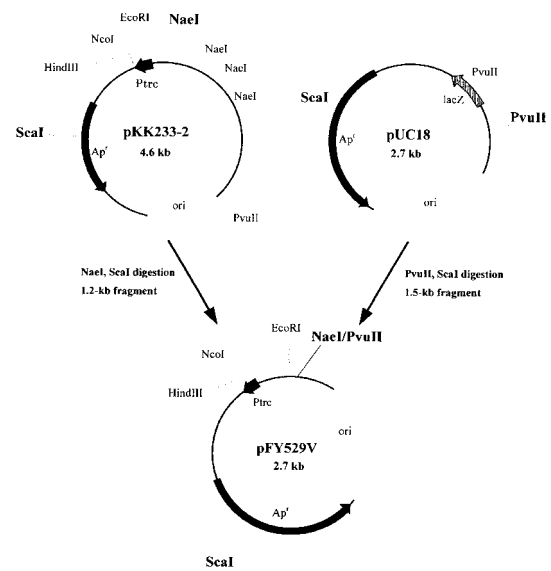
【 図 2 】



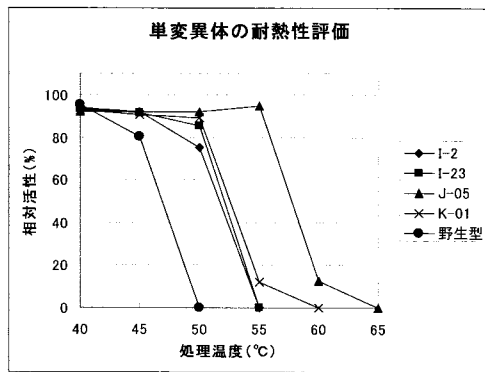
【 図 3 】



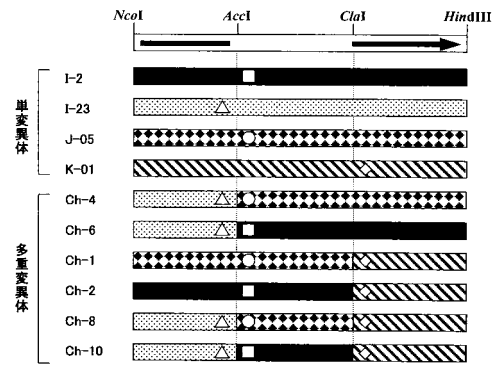
【 図 4 】



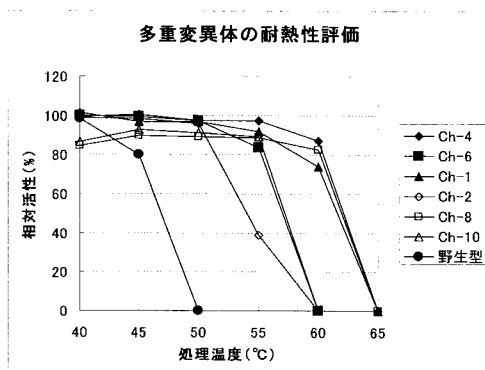
【図 5】



【図 6】



【図 7】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 9/88	C 1 2 P 13/00	
C 1 2 P 13/00	C 1 2 N 5/00	A

(72)発明者 中村 哲二

神奈川県横浜市鶴見区大黒町 1 0 番 1 号 三菱レイヨン株式会社化成品開発研究所内

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA07 CA04 CA05 CA11 DA06 HA01 HA06
4B050 CC04 DD02 HH02 LL01
4B064 AE01 CA21 CC24 CD07 CD12 DA01
4B065 AA01Y AA26X AB01 CA27 CA44