

【公報種別】特許法第 17 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 17 年 3 月 10 日 (2005.3.10)

【公開番号】特開 2003-93091 (P2003-93091A)

【公開日】平成 15 年 4 月 2 日 (2003.4.2)

【出願番号】特願 2002-208987 (P2002-208987)

【国際特許分類第 7 版】

C 1 2 P 19/26

// C 1 2 N 15/09

【F I】

C 1 2 P 19/26 Z N A

C 1 2 N 15/00 A

【手続補正書】

【提出日】平成 16 年 4 月 1 日 (2004.4.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

N - アセチルグルコサミン (G l c N A c)、ピルビン酸およびシチジン 5' - モノリン酸 (C M P) を含有する反応系に、酵母菌体、N - アセチルグルコサミン - 6 リン酸 2 - エピメラーゼ (G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ)、N - アセチルノイラミン酸リアーゼ (N e u A c リアーゼ) および C M P - N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (C M P - N e u A c シンセターゼ) を添加し、反応させることを特徴とする、C M P - N - アセチルノイラミン酸 (C M P - N e u A c) の製造法。

【請求項 2】

N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) およびピルビン酸を含有する反応系に、N - アセチルグルコサミン - 6 リン酸 2 - エピメラーゼ (G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ) および N - アセチルノイラミン酸リアーゼ (N e u A c リアーゼ) を添加して N - アセチルノイラミン酸 (N e u A c) を合成し、続けて、この反応系にシチジン 5' - モノリン酸 (C M P)、酵母菌体およびシチジン 5' - モノリン酸 N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (C M P - N e u A c シンセターゼ) を添加して C M P - N - アセチルノイラミン酸 (C M P - N e u A c) を合成する、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 3】

G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ、N e u A c リアーゼ及び C M P - N e u A c シンセターゼとして、細胞 (形質転換体を含む) またはその処理物を使用する、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 4】

G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼと N e u A c リアーゼのそれぞれの活性を増強させた形質転換体と C M P - N e u A c シンセターゼ活性を有する菌体処理物を使用する、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 5】

N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) およびシチジン 5' - モノリン酸 (C M P) を含有する反応系に、酵母菌体、N - アセチルグルコサミン - 6 リン酸 2 - エピメラーゼ (G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ)、N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (N e u A c シンセターゼ) および C M P - N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (C

M P - N e u A c シンセターゼ)を添加し、反応させることを特徴とする、C M P - N - アセチルノイラミン酸 (C M P - N e u A c) の製造法。

【請求項 6】

G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ、N e u A c シンセターゼ及び C M P - N e u A c シンセターゼとして、細胞 (形質転換体を含む) またはその処理物を使用する、請求項 1 記載の製造法。

【請求項 7】

G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼと N e u A c シンセターゼのそれぞれの活性を増強させた形質転換体と C M P - N e u A c シンセターゼ活性を有する菌体処理物を使用する、請求項 1 記載の製造法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

すなわち、本発明は、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c)、ピルビン酸およびシチジン 5 ' - モノリン酸 (C M P) を含有する反応系に、酵母菌体、N - アセチルグルコサミン - 6 リン酸 2 - エピメラーゼ (G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ)、N - アセチルノイラミン酸リアーゼ (N e u A c リアーゼ)、および C M P - N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (C M P - N e u A c シンセターゼ)を添加し、反応させることを特徴とする、C M P - N - アセチルノイラミン酸 (C M P - N e u A c) の製造法に関するものである。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 4

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 4】

また、本発明は、N - アセチルグルコサミン (G l c N A c) およびシチジン 5 ' - モノリン酸 (C M P) を含有する反応系に、酵母菌体、N - アセチルグルコサミン - 6 リン酸 2 - エピメラーゼ (G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ)、N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (N e u A c シンセターゼ) および C M P - N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (C M P - N e u A c シンセターゼ)を添加し、反応させることを特徴とする、C M P - N - アセチルノイラミン酸 (C M P - N e u A c) の製造法に関するものである。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 5

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 5】

本発明の C M P - N e u A c の合成反応経路を模式的に示すと、以下の (A) N e u A c リアーゼを用いた方法と (B) N e u A c シンセターゼを用いた方法である。なお、(B) の反応系に必須のホスホエノールピルビン酸 (P E P) は、培地中のグルコースから酵母並びに大腸菌の生体 (代謝) 反応により合成、供給されるので、反応系にホスホエノールピルビン酸 (P E P) を添加する必要はない。

【手続補正 5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

(1) 酵素等の調製

上記(A)及び(B)の反応系に添加するN - アセチルグルコサミン - 6リン酸 2 - エピメラーゼ (GlcNAc - 6P 2 - エピメラーゼ) とは、上記丸1のGlcNAc 6 - リン酸からManNAc 6 - リン酸への変換反応を触媒する活性を有するものを意味し、上記(A)の反応系に添加するN - アセチルノイラミン酸リアーゼ (NeuAcリアーゼ) とは、上記丸2のManNAcとピルビン酸を基質としてNeuAcを合成する反応を触媒する活性を有するものを意味し、上記(B)の反応系に添加するN - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (NeuAcシンセターゼ) とは、上記丸4のManNAcとホスホエノールピルビン酸 (PEP) を基質としてNeuAcを合成する反応を触媒する活性を有するものを意味し、上記(A)及び(B)の反応系に添加するCMP - N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ (CMP - NeuAcシンセターゼ) とは、上記丸3のNeuAcとCTPを基質としてCMP - NeuAcを合成する反応を触媒する活性を有するものを意味する。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0020

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0020】

これらの酵素活性を有するものとしては、当該活性を有する細胞（形質転換体を含む）またはその処理物を例示でき、調製の簡便性などの点から、微生物由来のものを使用するのが好都合である。微生物由来のGlcNAc - 6P 2 - エピメラーゼ、N - アセチルノイラミン酸リアーゼ、N - アセチルノイラミン酸シンセターゼ及びCMP - NeuAcシンセターゼは公知の酵素であり、常法により調製することができる。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0021

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0021】

また、当該酵素活性を増強させるための手段として、該酵素遺伝子群 (J.Bacteriol., 181, 47-54, 1999、J.Bacteriol., 181, 4526-4532, 1999、Nucleic Acids.Res., 13, 8843-8852, 1985、Agric.Biol.Chem., 50, 2155-2158, 1986、FEMS Microbiol.Lett., 75, 161-166, 1992、J. Biol.Chem., 271, 15373-15380, 1996、J.Biol.Chem., 264, 14769-14774, 1989、J.Bacteriol., 177, 312-319, 1995、Mol.Microbiol., 35, 1120-1134, 2000) をクローン化し、菌体内でこれを大量発現させた微生物種を用いる、いわゆる組換えDNA手法を用いるのが好適である。その際に、2つ以上の遺伝子を共発現させて得られる菌体またはその処理物を用いることもでき、特に、GlcNAc - 6P 2 - エピメラーゼとN - アセチルノイラミン酸リアーゼのそれぞれの酵素活性を増強させた形質転換体、またはGlcNAc - 6P 2 - エピメラーゼとN - アセチルノイラミン酸シンセターゼのそれぞれの酵素活性を増強させた形質転換体の使用が好適であるが、これに限定されない。

【手続補正8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0031

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0031】

(Neu A c リアーゼを用いた方法)

C M P - N e u A c の合成反応は、G l c N A c、C M P およびピルビン酸を含有する反応系に、G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ、N e u A c リアーゼ、および C M P - N e u A c シンセターゼを反応液 1 m L 当たりそれぞれ 0 . 2 m g 以上、好ましくは 2 ~ 1 0 0 m g、乾燥酵母を 1 ~ 2 0 % (w / v) 添加し、5 0 以下、好ましくは 1 5 ~ 4 0 で 1 ~ 1 5 0 時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 2】

また、上記反応においては、G l c N A c およびピルビン酸を含有する反応系に、G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼおよび N e u A c リアーゼを添加し、5 0 以下、好ましくは 1 5 ~ 4 0 で 1 ~ 5 0 時間程度反応させて N e u A c を合成し、次いで C M P、酵母菌体および C M P - N e u A c シンセターゼを添加し、5 ~ 5 0 時間程度反応させて C M P - N e u A c を合成する 2 段階の反応を行うことで C M P - N e u A c の合成収率を向上させることができる。なお、C M P はあらかじめ N e u A c 合成時に反応系に添加しておいてもかまわない。

【手続補正 1 0】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 3 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 3 3】

(N e u A c シンセターゼを用いた方法)

C M P - N e u A c の合成反応は、G l c N A c 及び C M P を含有する反応系に、G l c N A c - 6 P 2 - エピメラーゼ、N e u A c シンセターゼ、および C M P - N e u A c シンセターゼを反応液 1 m L 当たりそれぞれ 0 . 2 m g 以上、好ましくは 2 ~ 1 0 0 m g、乾燥酵母を 1 ~ 2 0 % (w / v) 添加し、5 0 以下、好ましくは 1 5 ~ 4 0 で 1 ~ 1 5 0 時間程度、必要により攪拌しながら反応させることにより実施できる。

【手続補正 1 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 4 9

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 4 9】

(5) C M P - N e u A c シンセターゼをコードする n e u A 遺伝子のクローニング
H . i n f l u e n z a e R d 株の染色体 D N A をテンプレートとして、以下に示す 2 種類のプライマー D N A を常法に従って合成し、P C R 法により H . i n f l u e n z a e の C M P - N e u A c シンセターゼ (n e u A) 遺伝子を増幅した。

プライマー (E) : 5 ' - T G C C A T G G T G A A A A T A A T A T G A C A A G A A - 3 '

プライマー (F) : 5 ' - A A C T G C A G T G C A G A T C A A A A G T G C G G C C - 3 '

【手続補正 1 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 5 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 5 2】

(6) C M P - N e u A c シンセターゼの調製

プラスミド pTrcsiaBNP を保持する大腸菌 JM109 菌を、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含有する $2 \times \text{YT}$ 培地 100 mL に植菌し、 37°C で振とう培養した。 4×10^8 個/ mL に達した時点で、培養液に最終濃度 0.25 mM になるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 6 時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 ($9,000 \times g$, 10 分) により菌体を回収し、 5 mL の緩衝液 (100 mM トリス塩酸 ($\text{pH} 7.8$)、 10 mM MgCl_2) に懸濁した。超音波処理を行って菌体を破碎し、さらに遠心分離 ($20,000 \times g$, 10 分) により菌体残さを除去した。

【手続補正 13】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0056

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0056】

(7) CMP - NeuAc の合成

上記 (3) で構築したプラスミド pTrcAE を保持する大腸菌 K-12 株 ME8417 (FERM BP-6847: 平成 11 年 8 月 18 日 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 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 305-8566))) にさせ、これを、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含有する $2 \times \text{YT}$ 培地 500 mL に植菌し、 37°C で振とう培養した。菌体数が 4×10^8 個/ mL に達した時点で、培養液に最終濃度 0.2 mM になるように IPTG を添加し、さらに 37°C で 8.5 時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 ($9,000 \times g$, 10 分) により 25 mL 培養液分の菌体 50 mg を回収し、これに 50 mM CMP、 100 mM GlcNAc、 20 mM 塩化マグネシウム、 50 mM グルコース、 250 mM ビルビン酸ナトリウム、 0.5% (v/v) キシレンを含有する 200 mM リン酸カリウム緩衝液 ($\text{pH} 8.0$) 5 mL を添加し、 28°C で攪拌しながら反応を行った。

【手続補正 14】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0057

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0057】

反応開始 24 時間後に乾燥パン酵母 (オリエンタル酵母社製) 250 mg 、上記 (6) で調製した CMP - NeuAc シンセターゼ ($3.4 \text{ units}/\text{mL}$ 反応液) 及び 1 M 塩化マグネシウム溶液 $100 \mu\text{L}$ を添加し、合計 62 時間反応させた。なお、反応開始 14 時間後に 110 mg のビルビン酸ナトリウムを、24、38 時間後に 110 mg ビルビン酸ナトリウム、 180 mg グルコースを、48 時間後に 55 mg ビルビン酸ナトリウム、 180 mg グルコースをそれぞれ添加した。

反応液上清を HPLC により分析したところ、 21.4 mM の CMP - NeuAc が生成することが認められた。

【手続補正 15】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0061

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0061】

(2) cmk、neuA 遺伝子共発現プラスミドの構築

実施例 1 で得られた pTrcsiaBNP プラスミドを制限酵素 NcoI、EcoRI で切断し、neuA 遺伝子を含む NcoI - EcoRI 断片をアガロースゲル電気泳動を用いて回収した。これを同じく NcoI、EcoRI で消化した上記比較例 (1) の pTrcCMKAB プラスミドと T4 ライゲースを用いて連結した。この連結反応液を用いて大

腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミド p T r c S B C K を単離した。p T r c S B C K は、p T r c 9 9 A の t r c プロモーター下流の N c o I - S a c I 切断部位に H . i n f l u e n z a e の n e u A 遺伝子及び大腸菌の c m k 遺伝子の構造遺伝子を含む D N A 断片が挿入されたものである。

【手続補正 1 6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 6 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 6 8】

遺伝子増幅後、反応液をフェノール/クロロホルム (1 : 1) 混合液で処理し、水溶性画分に 2 倍容のエタノールを添加し D N A を沈殿させた。沈殿回収した D N A をアガロースゲル電気泳動により分離し、1 . 2 k b 相当の D N A 断片を精製した。該 D N A を制限酵素 B a m H I 及び P s t I で切断し、同じく制限酵素 B a m H I 及び P s t I で消化したプラスミド p T r c 9 9 A (P h a r m a c i a B i o t e c h . 社より入手) と T 4 D N A リガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌 J M 1 0 9 株を形質転換し、得られたアンピシリン耐性形質転換体よりプラスミド p T r c n e u B 1 を単離した。p T r c n e u B 1 は、p T r c 9 9 A の t r c プロモーター下流の B a m H I - P s t I 切断部位に C . j e j u n i の n e u B 1 遺伝子の構造遺伝子を含む D N A 断片が挿入されたものである (F E R M P - 1 8 9 0 5 ; 平成 1 4 年 6 月 2 5 日 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 (日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番地 1 中央第 6 (郵便番号 3 0 5 - 8 5 6 6) ; 平成 1 4 年 1 1 月 2 2 日付けで F E R M B P - 8 2 4 8 に変更)) 。

【手続補正 1 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 7 0

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 7 0】

(3) C M P - N e u A c の合成

上記 (2) で調製したプラスミド p T r c N E N B を保持する大腸菌 M C 1 0 6 1 株 (A T C C 5 3 3 3 8) の 2 5 m l 培養液分の菌体 5 0 m g に 5 0 m M C M P 、 1 0 0 m M G l c N A c 、 3 0 m M 塩化マグネシウム、 2 0 0 m M グルコース、 1 0 0 m M ビルビン酸ナトリウム、 0 . 5 % (v / v) キシレン、 4 % (w / v) 乾燥パン酵母 (オリエントアル酵母社製) 、並びに実施例 1 の (6) で調製した C M P - N e u A c シンセターゼ (1 . 7 u n i t s / m l 反応液) を含む 1 7 5 m M リン酸カリウム緩衝液 (p H 8 . 0) 5 m l を添加し、 2 8 で攪拌しながら 7 2 時間反応を行った。なお、反応開始 1 4 、 2 4 、 3 8 、 4 8 、 6 2 時間後に 1 8 0 m g グルコースをそれぞれ添加した。反応液上清を H P L C により分析したところ、 2 5 . 6 m M の C M P - N e u A c 生成が認められた。