

【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 12 P 19/26

// C 12 N 15/09

【F I】

C 12 P 19/26 Z N A

C 12 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(GlcNAc)、ピルビン酸およびシチジン5'-モノリン酸(CMP)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(GlcNAc-6P2-エピメラーゼ)、N-アセチルノイラミン酸リアーゼ(NeuAcリアーゼ)および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)を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸(CMP-NeuAc)の製造法。

【請求項2】

N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)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(GlcNAc-6P2-エピメラーゼ)およびN-アセチルノイラミン酸リアーゼ(NeuAcリアーゼ)を添加してN-アセチルノイラミン酸(NeuAc)を合成し、続けて、この反応系にシチジン5'-モノリン酸(CMP)、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(CMP-NeuAcシンセターゼ)を添加してCMP-N-アセチルノイラミン酸(CMP-NeuAc)を合成する、請求項1記載の製造法。

【請求項3】

GlcNAc-6P2-エピメラーゼ、NeuAcリアーゼ及びCMP-NeuAc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】

GlcNAc-6P2-エピメラーゼとNeuAcリアーゼのそれぞれの活性を増強させた形質転換体とCMP-NeuAc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(GlcNAc)およびシチジン5'-モノリン酸(CMP)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(GlcNAc-6P2-エピメラーゼ)、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ(NeuAcシンセターゼ)およびCMP-N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ(C

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

【請求項6】

GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ、NeuAcシンセターゼ及びCMP-NeuAc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】

GlcNAc-6P 2-エピメラーゼとNeuAc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CMP-NeuAc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】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

すなわち、本発明は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ピルビン酸およびシチジン5'-モノリン酸(CMP)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(GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ)、N-アセチルノイラミン酸リアーゼ(NeuAcリアーゼ)、および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)を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸(CMP-NeuAc)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】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

また、本発明は、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)およびシチジン5'-モノリン酸(CMP)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(GlcNAc-6P 2-エピメラーゼ)、N-アセチルノイラミン酸シンセターゼ(NeuAcシンセターゼ)および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)を添加し、反応させることを特徴とする、CMP-N-アセチルノイラミン酸(CMP-NeuAc)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】0015

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0015】

本発明のCMP-NeuAcの合成反応経路を模式的に示すと、以下の(A)NeuAcリアーゼを用いた方法と(B)NeuAc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(PEP)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(PEP)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】0019

【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-6P2-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とビ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ManAcとホスホエノールビルビン酸(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-6P2-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)をクローニングし、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-6P2-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-6P2-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】

(NeuAcリアーゼを用いた方法)

CMP-NeuAcの合成反応は、GlcNAc、CMPおよびピルビン酸を含有する反応系に、GlcNAc-6P2-エピメラーゼ、NeuAcリアーゼ、およびCMP-NeuAcシンセターゼを反応液1mL当たりそれぞれ0.2mg以上、好ましくは2~100mg、乾燥酵母を1~20%(w/v)添加し、50以下、好ましくは15~40で1~150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】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

また、上記反応においては、GlcNAcおよびピルビン酸を含有する反応系に、GlcNAc-6P2-エピメラーゼおよびNeuAcリアーゼを添加し、50以下、好ましくは15~40で1~50時間程度反応させてNeuAcを合成し、次いでCMP、酵母菌体およびCMP-NeuAcシンセターゼを添加し、5~50時間程度反応させてCMP-NeuAcを合成する2段階の反応を行うことでCMP-NeuAcの合成収率を向上させることができる。なお、CMPはあらかじめNeuAc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10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0033

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0033】

(NeuAcシンセターゼを用いた方法)

CMP-NeuAcの合成反応は、GlcNAc及びCMPを含有する反応系に、GlcNAc-6P2-エピメラーゼ、NeuAcシンセターゼ、およびCMP-NeuAcシンセターゼを反応液1mL当たりそれぞれ0.2mg以上、好ましくは2~100mg、乾燥酵母を1~20%(w/v)添加し、50以下、好ましくは15~40で1~150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11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0049

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0049】

(5) CMP-NeuAcシンセターゼをコードするneuA遺伝子のクローニング
H. influenzae Rd株の染色体DNAをテンペレートとして、以下に示す2種類のプライマーDNAを常法に従って合成し、PCR法によりH. influenzaeのCMP-NeuAcシンセターゼ(neuA)遺伝子を増幅した。

プライマー(E): 5' - TGCCATGGTGAAATAATAATGACAAGAA -3'

プライマー(F): 5' - AACTGCAGTGCAGATCAAAAGTGCAGGCC -3'

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0052

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0052】

(6) CMP-NeuAc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 µg / mL のアンピシリンを含有する 2 × YT 培地 100 mL に植菌し、37 度で振とう培養した。4 × 10⁸ 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 度で 6 時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 (9,000 × 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 (pH 7.8)、10 mM MgCl₂) 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 × 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 pTrcA-E 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 µg / mL のアンピシリンを含有する 2 × YT 培地 500 mL に植菌し、37 度で振とう培養した。菌体数が 4 × 10⁸ 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 度で 8.5 時間振とう培養を続けた。培養終了後、遠心分離 (9,000 × 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 ピ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 (pH 8.0) 5 mL を添加し、28 度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 units / mL 反応液) 及び 1 M 塩化マグネシウム溶液 100 µL 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 のピルビン酸ナトリウムを、24、38 時間後に 110 mg ピルビン酸ナトリウム、180 mg グルコースを、48 時間後に 55 mg ピ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 で切斷し、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JM109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pTrcSBCKを単離した。pTrcSBCKは、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のNcoI-SacI切断部位にH.influenzaeのneuA遺伝子及び大腸菌のcmk遺伝子の構造遺伝子を含有するDNA断片が挿入されたものである。

【手続補正16】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0068

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0068】

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DNAを沈殿させた。沈殿回収したDNAをアガロースゲル電気泳動により分離し、1.2kb相当のDNA断片を精製した。該DNAを制限酵素BamHI及びPstIで切斷し、同じく制限酵素BamHI及びPstIで消化したプラスミドpTrc99A(Pharmacia Biotech.社より入手)とT4DNAリガーゼを用いて連結した。連結反応液を用いて大腸菌JM109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pTrcneuB1を単離した。pTrcneuB1は、pTrc99Aのtrcプロモーター下流のBamHI-PstI切斷部位にC.jejuniのneuB1遺伝子の構造遺伝子を含有するDNA断片が挿入されたものである(FERM P-18905:平成14年6月25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);なお、平成14年11月22日付けでFERM BP-8248に変更)。

【手続補正17】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0070

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0070】

(3) CMP-NeuAcの合成

上記(2)で調製したプラスミドpTrcNEFBを保持する大腸菌MC1061株(ATCC53338)の25ml培養液分の菌体50mgに50mM CMP、100mM GlcNAc、30mM 塩化マグネシウム、200mM グルコース、100mM ピ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(オリエンタル酵母社製)、並びに実施例1の(6)で調製したCMP-NeuAcシンセターゼ(1.7units/ml反応液)を含有する175mMリン酸カリウム緩衝液(pH8.0)5mLを添加し、28℃で攪拌しながら72時間反応を行った。なお、反応開始14、24、38、48、62時間後に180mg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、25.6mMのCMP-NeuAc生成が認められた。