

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4040736号
(P4040736)

(45) 発行日 平成20年1月30日(2008.1.30)

(24) 登録日 平成19年11月16日(2007.11.16)

(51) Int.Cl.		F I	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 Z N A A
C O 7 K 19/00 (2006.01)		C O 7 K	19/00
C 1 2 N 1/21 (2006.01)		C 1 2 N	1/21
C 1 2 N 9/06 (2006.01)		C 1 2 N	9/06 B
C 1 2 R 1/66 (2006.01)		C 1 2 N	15/00 Z N A A

請求項の数 4 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-28169
 (22) 出願日 平成10年2月10日(1998.2.10)
 (65) 公開番号 特開平11-221081
 (43) 公開日 平成11年8月17日(1999.8.17)
 審査請求日 平成17年2月2日(2005.2.2)

微生物の受託番号 FERM BP-5981

(73) 特許権者 000141897
 アークレイ株式会社
 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100087114
 弁理士 齋藤 みの里
 (72) 発明者 谷 ▲吉▼樹
 京都府京都市北区上賀茂菫蒲園町56, 6
 O番台地-1
 (72) 発明者 桂樹 徹
 大阪府堺市鴨谷台3丁3-2-803

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 耐熱性フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列、該配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと、グルタチオンS-トランスフェラーゼとの融合タンパク質であって、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する組換えタンパク質。

【請求項2】

請求項1記載のタンパク質をコードするDNA。

【請求項3】

請求項2記載のDNAを導入された形質転換体。

【請求項4】

請求項3記載の形質転換体を培養し、その培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する生成物を回収することからなる、グルタチオンS-トランスフェラーゼとフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有するポリペプチドとの融合タンパク質の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、熱安定性の優れたフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ活性を有する組換えタンパク質に関する。

【 0 0 0 2 】

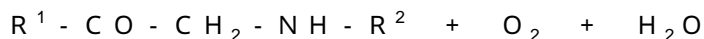
【従来の技術】

フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、F A O Dと略称する）は酸化還元酵素の1つであって、例えば、臨床及び食品の分野でアマドリ化合物の分析に有用であることが知られている。アマドリ化合物とは、タンパク質等のアミノ基を有する物質のアミノ基と、アルドース等の還元性の糖のアルデヒド基とが非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移して生成する糖化タンパクである。生体内では、グルコースとアミノ酸が結合してフルクトシルアミン誘導体が生成し、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、血液中のタンパクが糖化された誘導体はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、過去の一定期間の平均血糖値を反映していることから、その測定値は、糖尿病の症状の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は臨床上、極めて有用である。また、食品中のアマドリ化合物を定量することにより、その食品の製造後の保存状況や期間を知ることができ、品質管理に役立つと考えられる。

10

【 0 0 0 3 】

アマドリ化合物の定量は、以下の反応式で表されるように、酸化還元酵素の作用によって生成する過酸化水素の量、又は消費される酸素の量に基づいて行われる。



（式中、 R^1 はアルドース残基、 R^2 はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す）

上記反応に用いる酵素として、本出願人は、アスペルギルス属（*Aspergillus*）由来の菌が産生するフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ（以下、F A O D - Lという）を見出し、そのDNA組換え技術による製造に成功した（特願平8 - 193344）。

20

【 0 0 0 4 】

【発明が解決すべき課題】

しかしながら、これら天然又は組換え技術で得られた酵素は、40 付近で不安定になる傾向があるために、保管、輸送に際して失活する恐れがあり、取り扱いが困難であった。また、通常、測定に先立って被検試料をプロテアーゼ処理するが、プロテアーゼを不活化するためにインヒビターを用いている。そのために、操作手順が繁雑になり、自動分析装置や測定者に過大な負担がかかるという問題点があった。また、従来法によれば、硫安沈殿、ゲルろ過及びイオン交換樹脂等のカラム精製及び透析等の様々な工程を経て酵素を精製する必要があり、時間及び手間がかかる上、十分な収率をあげることができなかった。

30

【 0 0 0 5 】

【課題を解決するための手段】

本発明は、従来のF A O D - Lに比較して熱安定性に優れた酵素であって、配列表の配列番号1に記載のアミノ酸配列、該配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドと、グルタチオン S - トランスフェラーゼ（以下、G S Tと略す）との融合タンパク質であって、F A O D活性を有する組換えタンパク質を提供するものである。

【 0 0 0 6 】

本発明の組換えタンパク質は、アスペルギルス・テレウス G P 1（*Aspergillus terreus* GP1；FERM BP-5684）が産生するF A O D - Lと、G S Tとの融合タンパク質であり、後述するように、F A O D - Lの酵素活性は維持したまま、極めて優れた熱安定性を示すことから、上記の従来技術における課題を解決し、例えば、プロテアーゼインヒビターを使用せず、加熱処理により、プロテアーゼを不活化することができ、実用性に優れた、有用な酵素である。しかも、精製工程が極めて簡単であり、収率が低下する恐れも少ないという利点がある。

40

G S T（EC2.5.1.18）は様々な生物に見出され、立体構造研究が最も進んでいる薬物代謝酵素である（ファルマシア、360-364頁、Vol.33, No.4,1997）。本発明に用いたG S Tは、*Schistosoma japonicum*より見出されたものであって、分子量は約26,000である。

50

本発明の組換えタンパク質は、F A O Dが使用される様々な分野で、それら酵素と同様に用いることができ、特に、上記のアマドリ化合物の分析に有用である。

【0007】

【発明の実施の形態】

F A O D - LをコードするDNAは、一般に入手可能なE.coli SOLR/pFAL2 FERM BP-5981から常法に従って単離することができる。そのようにして得られるF A O D - LをコードするDNAの塩基配列と推定のアミノ酸配列を配列番号1に示す。本発明の目的には、配列番号1に示した全アミノ酸配列を有するF A O D - Lのみならず、所望の酵素活性を有するそのアミノ酸配列における変異体も同様に有用である。そのような変異体は、当業者既知の方法で、アミノ酸の欠失、置換及び/又は挿入により誘導することができる。

10

【0008】

本発明の融合タンパク質の製造に際しては、まず、E.coli SOLR/pFAL2 FERM BP-5981からF A O D - LのcDNAを抽出する。次いで、このcDNAとGSTをコードするDNAとを適当な発現ベクター内で連結して融合タンパク質の発現ベクターを構築する。そのような発現ベクターは、予め、F A O D - LのcDNAとGST DNAとを連結した後、適当な発現ベクターに挿入するか、あるいは、後述の実施例に記載のごとく、融合タンパク質としてGST及びF A O D - LをコードするDNAが発現されるように、適当なGSTの発現ベクター(例、pGEX)にF A O D - LのcDNAを挿入することにより、構築することができる。このようにして得られた発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、適当な培地で培養すると、目的の融合タンパク質が生産される。得られた融合タンパク質の精製については、無細胞抽出液をGlutathion Sepharose 4B カラム(ファルマシア製)に吸着させ、トリス-塩酸緩衝液で洗浄した後、グルタチオンを含む同緩衝液で溶出する。なお、一連の操作は、当該技術分野で入手可能な制限酵素、宿主細胞、発現ベクターを用い、当業者既知の方法で行うことができる。

20

【0009】

以下に実施例を挙げて本発明を詳しく説明するが、これらは本発明を制限するものではない。以下の実施例で用いたプラスミド類、様々な制限酵素やT4DNAリガーゼ、その他の酵素類は、市販品から入手し、供給者の指示に従って使用した。また、DNAのクローニング、各プラスミドの構築、宿主の形質転換、形質転換体の培養及び培養物からの酵素の回収は、当業者既知の方法、あるいは文献記載の方法に準じて行なった。また、酵素活性は以下の力価の測定法に従って測定した。

30

【0010】

力価測定法

生成する過酸化水素を比色法により測定する方法(速度法)

100mM FZL(N-Z-リジン)溶液はあらかじめ得られたFZLを蒸留水で溶解することによって調製する。45mM 4-アミノアンチピリン、60ユニット/mlパーオキシダーゼ溶液、及び60mM フェノール溶液それぞれ100 μ lと、0.1M トリス-塩酸緩衝液(pH 8.0) 1ml、及び酵素溶液50 μ lを混合し、全量を蒸留水で3.0mlとする。30 $^{\circ}$ Cで平衡化した後、100mM FZL溶液50 μ lを添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定する。生成するキノン色素の分子吸光係数(5.16 $\times 10^3$ M $^{-1}$ cm $^{-1}$)から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位とする。

40

【0011】

実施例1 融合タンパク質の製造

1. F A O D - LのcDNAの抽出

E.coli SOLR/pFAL2 (FERM BP-5981)は、アスペルギルス・テレウスGP1(Aspergillus terreus GP1; FERM BP-5684)からクローニングされたF A O D - LのcDNAを有する形質転換体である。このE.coli SOLR/pFAL2 (FERM BP-5981)を50 μ l/mlのアンピシリンを含む2 \times YT培地5mlで、37 $^{\circ}$ C、10時間培養し、次いで、菌体を集菌し、以下の方法に従ってプラスミドの抽出を行った。

50

培養液 3 ml から得た菌体を TE 緩衝液で洗浄する。次に、Solution I (50 mM グルコース、25 mM トリス - 塩酸 (pH 8.0)、10 mM EDTA) 50 μ l に菌体を懸濁したのち、10 mg/ml のリゾチーム 50 μ l を加え、軽くボルテックスし、室温で 5 分間放置する。次に、Solution II (0.2 N 水酸化ナトリウム、1% SDS) を加えて穏やかに攪拌し、5 分間氷冷する。次に、5 M の酢酸カリウムを 150 μ l 加えて攪拌後、5 分間氷冷する。氷冷終了後、4、12,000 rpm、5 分間の遠心を行い、上清を別のマイクロチューブに移す。これを 2 度、フェノール/クロロホルムで抽出して精製し、2 倍量のエタノールを加えてエタノール沈殿させる。これを 70% エタノールで洗浄した後、減圧して乾燥させる。

【 0012 】

次いで、これを 50 μ l の TE 緩衝液に溶解し、RNase を 1 μ l 加えて 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させる。反応終了後、20% PEG / 2.5 N 塩化ナトリウムを 30 μ l 加え、穏やかにボルテックスした後、1 時間氷冷する。その後、4、14,000 rpm、20 分間遠心し、プラスミドを沈殿させる。そして、70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥し、20 μ l の TE 緩衝液に溶解する。

上の操作で得たプラスミド pFAL2 の制限地図を図 1 に示す。pFAL2 は約 4.5 kb のプラスミドで、lac プロモーターの下流に FAOD - L の cDNA が EcoRI ~ XhoI で挿入されている。

【 0013 】

2. FAOD - L の cDNA の増幅

配列番号 1 に記載の FAOD - L の塩基配列の N - 末端および C - 末端から PCR 用のプライマーを設計した。プライマーには、プラスミドへの接続のための制限酵素部位 (EcoRI) を接続した。2 つのプライマー (pFAL5 (配列番号 2) 及び pFAL3 (配列番号 3)) を合成した。上記 (1) で得たプラスミド pFAL2 とこれら 2 つのプライマー、及び Taq ポリメラーゼ (TaKaRa Ex Taq ; 宝酒造社製) を用い、供給者の指示に従って、以下の手順で PCR を行った。すなわち、(94 $^{\circ}$ C , 1 分 ; 60 $^{\circ}$ C , 1 分 ; 72 $^{\circ}$ C , 2 分) からなる一連の処理を 30 サイクル行った後、72 $^{\circ}$ C で 2 分処理して PCR を行った。

この操作により、約 1.5 kb の FAOD - L の cDNA が増幅された。そして、この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にかけ、Sephaglas Band Prep Kit (ファルマシア社製) を用いて切り出した。

【 0014 】

3. FAOD - L の cDNA の、GST 発現ベクターへのライゲーション

上の操作で得た FAOD - L の cDNA を GST 発現ベクターである pGEX - 4T - 1 (ファルマシア社製、以下、pGEX ベクターという) に接続した。この pGEX ベクターのマルチクローニングサイト (MCS) の上流には、GST をコードする DNA が挿入されている。

まず、pGEX ベクターを制限酵素 EcoRI で処理し、得られた制限酵素処理物をアルカリホスファターゼ (Calf intestine ; 宝酒造社製) で、供給者の指示に従って処理した。

次に、PCR で得た FAOD - L の cDNA を制限酵素 EcoRI で処理した。

次いで、pGEX の制限酵素処理物と FAOD - L の cDNA の制限酵素処理物とを、T4 DNA Ligase (宝酒造社製) を用い、供給者の指示に従ってライゲーションした。この操作により、FAOD - L の cDNA が pGEX ベクターの EcoRI 部位に挿入され、GST DNA と FAOD - L DNA とが、5' 側から直列に並んで挿入されているプラスミド pFALG1 を得た。このプラスミド pFALG1 の制限地図を図 2 に示す。

【 0015 】

4. 大腸菌の形質転換

上記の操作で得たプラスミド pFALG1 を用いて大腸菌 JM109 株を形質転換した。大腸菌のコンピテントセルの調製は常法に従って行った。大腸菌形質転換株をアンピシリン、IPTG を含む 2 x TY プレートで培養し、形質転換株のみを常法通り選別した。

10

20

30

40

50

【0016】

5. FAOD-LのcDNA挿入株の選別

上で得た大腸菌を培養したプレートをろ紙に転写し、1%のリゾチーム溶液で30、30分間処理して溶菌した。次に、これを室温下で風乾し、下記のFAOD発色液に浸漬させ、上記のFAOD酵素活性測定法(速度法)と同様、FAOD-Lを発現させている株を発色に基づいて特定し、それに対応する株をプレーから選別した。

0.1 M	トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)	10 ml	
45 mM	4-アミノアンチピリン溶液	1 ml	
60 mM	フェノール溶液	1 ml	10
60 U/ml	パーオキシダーゼ溶液	1 ml	
100 mM	FZL溶液 ¹⁾	0.5 ml	
	H ₂ O	16.5 ml	
合計		30 ml	

注1) : FZL : フルクトシル-N α -Z-リジン

【0017】

6. 大腸菌組換え株でのFAOD-L-GST融合タンパク質の発現

上の操作で選別した大腸菌形質転換株 *E. coli* JM109 / pFALG1 をジャーファーマンターで、28℃にて培養した。培地として50 μ l/mlのアンピシリンを含むLB培地(1L)を用い、100mM IPTG溶液を培養開始2時間後に培地の1/1000容量加えて発現を誘導した。培養中、2時間毎に菌体を1部集菌し、増殖(Growth; OD₆₀₀)と比活性(U/mg)を調べたところ、IPTG添加後8時間でFAOD生産が最大となった(図3参照)。図3中、上側の曲線(白丸)は、菌体の増殖、下側の曲線(黒丸)はFAODの発現量(比活性)を表している。

【0018】

7. FAOD-L-GST融合タンパク質の精製

融合タンパク質の精製については、無細胞抽出液をGlutathion Sepharose 4B カラム(ファルマシア製)に吸着させ、供給者の指示に従って、トリス-塩酸緩衝液で洗浄した後、グルタチオンを含む同緩衝液で溶出してアフィニティー精製し、12.2 U/mgの精製酵素を得た。この精製酵素をそのまま、以下の実験に用いた。なお、一連の操作は、当該技術分野で入手可能な制限酵素、宿主細胞、発現ベクターを用い、当業者既知の方法で行うことができる。

【0019】

8. FAOD-L-GST融合タンパク質の性質

1) 分子量

FAOD-L-GST融合タンパク質の分子量は、SDS-PAGEで確認した結果、74 kDaであった。これは、FAOD-L(分子量51 kDa)とGST(分子量26 kDa)との融合タンパク質であることを示している。

2) 基質特異性

融合タンパク質の基質特異性は、速度法で求めた場合、FZLに対して、12.2 U/mg、FV(フルクトシルバリン)に対して4.36 U/mgであり、FZL/FVは約3であった。これは、A. テレウスGP1から精製したFAOD-LのFZL/FVが約3であることと一致しており、非融合型のFAOD-Lとの基質特異性における同一性が確認された。

【0020】

3) 熱安定性

熱安定性は、対象となる温度で、上記7で精製した酵素を10分間インキュベートした後

10

20

30

40

50

、以下の組成の反応液で、30℃、30分間反応させ、505nmにおけるキノン色素の分子吸光係数 ($5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位とした。

0.1 M	トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0)	1000 μl	
45 mM	4-アミノアンチピリン溶液	100 μl	
60 mM	フェノール溶液	100 μl	
60 U/ml	パーオキシダーゼ溶液	100 μl	
100 mM	FZL溶液	50 μl	10
	酵素液 (12.2U/mg; インキュベート済み)	50 μl	
	H ₂ O	1600 μl	
	合計	3000 μl	

そして、20℃処理で得た数値を100とし、20～60℃における処理で得た数値を図4に表した。図4から明らかなように、FAOD-Lの場合には、50℃、10分間のインキュベーションでほぼ完全に失活するのに対し、本発明のFAOD-L-GST融合タンパク質の場合には、ほぼ100%の活性が維持されていた。40℃においても、活性の相違が認められた。

【0021】

【配列表】

【0022】

配列番号：1

配列の長さ：1 3 1 4

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

起源

10

生物名：Aspergillus terreus GP1

配列

ATG CCA GTC ACC AAG TCT TCG TCG ATA TTG ATC ATC GGG GCG GGC ACC 48

Met Pro Val Thr Lys Ser Ser Ser Ile Leu Ile Ile Gly Ala Gly Thr

1

5

10

15

TGG GGT TGC TCA ACT GCC CTG CAT CTT GCC CGC AGA GGA TAC ACC AAT 96

Trp Gly Cys Ser Thr Ala Leu His Leu Ala Arg Arg Gly Tyr Thr Asn

20

25

20

GTC ACT GTC CTT GAC CCG TAC CCG GTT CCA TCA GCC ATT TCG GCC GGC 144

Val Thr Val Leu Asp Pro Tyr Pro Val Pro Ser Ala Ile Ser Ala Gly

35

40

45

AAC GAC GTC AAC AAG ATC ATC TCG TCC GGC CAG TAC AGC AGC AAG AAG 192

Asn Asp Val Asn Lys Ile Ile Ser Ser Gly Gln Tyr Ser Ser Lys Lys

50

55

60

30

GAC GAG GTC GAA GTC AAT GAG ATT ATC GCC GAA CAG GCC TTC AAT GGC 240

Asp Glu Val Glu Val Asn Glu Ile Ile Ala Glu Gln Ala Phe Asn Gly

65

70

75

80

TGG AAA AAT GAC CCC ATC TTC AAG CCG TAC TAC CAC GAC ACC GGC GTC 288

Trp Lys Asn Asp Pro Ile Phe Lys Pro Tyr Tyr His Asp Thr Gly Val

85

90

95

GTG ATG TCC GCC ACC ACA CAG GAA GGA TTG GAG CGT CTG GGG GTC CGC 336

Val Met Ser Ala Thr Thr Gln Glu Gly Leu Glu Arg Leu Gly Val Arg

40

100	105	110	
GTG CGA CCT GAA GAT GAA CCC GAT GTA GCC GAA TTG ACT CGG CCG GAG	384		
Val Arg Pro Glu Asp Glu Pro Asp Val Ala Glu Leu Thr Arg Pro Glu			
115	120	125	
CAG TTC CGC CAG CTG GCC CCC GGC GTC TTG AAG GGT AAC TTC CCC GGT	432		
Gln Phe Arg Gln Leu Ala Pro Gly Val Leu Lys Gly Asn Phe Pro Gly			
130	135	140	10
TGG AGG GGG TAC CAC ATT CGC TCA AAC GCG GGC TGG GCG CAT GCG CGC	480		
Trp Arg Gly Tyr His Ile Arg Ser Asn Ala Gly Trp Ala His Ala Arg			
145	150	155	160
AAC GCC CTG GTC GCC GCG GCG CGG GAG GCA CAG CGC CTG GGT GTG CGC	528		
Asn Ala Leu Val Ala Ala Ala Arg Glu Ala Gln Arg Leu Gly Val Arg			
165	170	175	20
TTC GTC GCG GGA TCG CCG CAG GGC AGA GTC ATC ACG TTG ATT TTT GAG	576		
Phe Val Ala Gly Ser Pro Gln Gly Arg Val Ile Thr Leu Ile Phe Glu			
180	185	190	
AAC AAC GAT GTG AAG GGT GCC GTC ACG GCG GAC GGC AAG ATC TGG CGG	624		
Asn Asn Asp Val Lys Gly Ala Val Thr Ala Asp Gly Lys Ile Trp Arg			
195	200	205	
GCC GAG CAG ACT ATC CTC TGC GCT GGT GCG GCC GCC GGC CAG TTT CTG	672		
Ala Glu Gln Thr Ile Leu Cys Ala Gly Ala Ala Ala Gly Gln Phe Leu			30
210	215	220	
GAT TTC AAG GAC CAA CTG CGT CCC ACT GCG TGG ACT CTG GTC CAC ATC	720		
Asp Phe Lys Asp Gln Leu Arg Pro Thr Ala Trp Thr Leu Val His Ile			
225	230	235	240
CAG TTG AAG CCG GAA GAG CGT GCC CAG TAT AAA AAC ATG CCG GTG GTC	768		
Gln Leu Lys Pro Glu Glu Arg Ala Gln Tyr Lys Asn Met Pro Val Val			
245	250	255	40
TTC AAC ATC GAG AAG GGG TTC TTC TTC GAG CCG GAT GAG GAG CGT GGT	816		

GTC ATG GAT TTC AAT GAA GTG AAG GAG TGG ACT AAT GTC ACC CAA AGG 1296
 Val Met Asp Phe Asn Glu Val Lys Glu Trp Thr Asn Val Thr Gln Arg
 420 425 430

GAC ATC TCG AAG TTA TAG 1314
 Asp Ile Ser Lys Leu
 435 437

【 0 0 2 3 】

10

配列番号： 2

配列の長さ： 27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

20

GGAATTCATG CCAGTCACCA AGTCTTC 27

【 0 0 2 4 】

配列番号： 3

配列の長さ： 28

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：合成DNA

配列

GGAATTCCTA TAACTTCGAG ATGTCCT 28

【 図面の簡単な説明 】

【 図 1 】 FAOD-L をコードする DNA を含むプラスミド pFAL2 の制限地図。

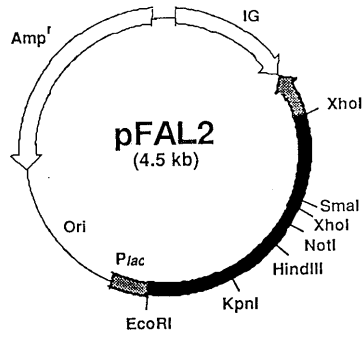
【 図 2 】 FAOD-L-GST をコードする DNA を含むプラスミド pFALG1 の制限地図。

40

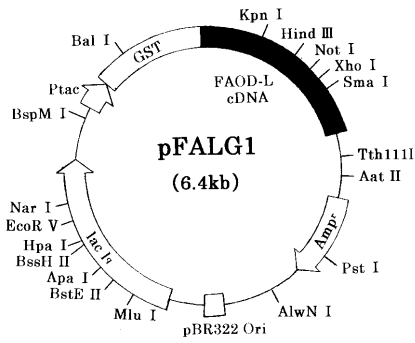
【 図 3 】 大腸菌形質転換株 *E. coli* JM109/pFALG1 の増殖 (OD_{600}) と比活性 (U/mg) との関係を示すグラフ。図中、白丸は、菌体の増殖 (OD_{600})、黒丸は FAOD の発現量 (U/mg) を表している。

【 図 4 】 FAOD-L-GST 融合タンパク質と FAOD-L の熱安定性を示すグラフ。

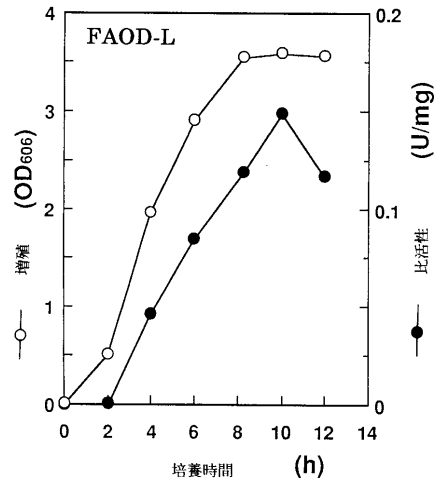
【 図 1 】



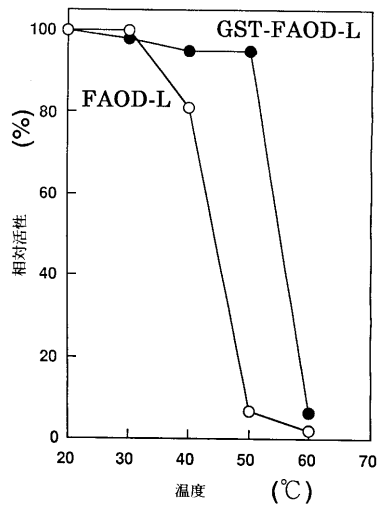
【 図 2 】



【 図 3 】



【 図 4 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 1 2 R 1/19 (2006.01) C 1 2 R 1:66
C 1 2 N 1/21
C 1 2 R 1:19
C 1 2 N 9/06 B
C 1 2 R 1:19

(72)発明者 吉田 信行
奈良県奈良市学園南3丁目15-35 学園南八イツ102号
(72)発明者 加藤 暢夫
京都府亀岡市西つつじヶ丘美山台2丁目3番18号
(72)発明者 福家 博司
京都府京都市南区東九条西明田町57番地 株式会社京都第一科学内

審査官 福間 信子

(56)参考文献 Eur. J. Biochem. , 1996年, vol.242, p.499-505

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/Geneseq
PubMed
JMEDPlus(JDream2)
JSTPlus(JDream2)